

マウス歯原性上皮細胞株におけるThymosin beta 4によるRunx2発現調節メカニズムの検索

染矢, 祐孝

<https://doi.org/10.15017/1500638>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

マウス歯原性上皮細胞株における
Thymosin beta 4 による Runx2 発現調節メカニズムの検索

2015 年

染矢 祐孝

九州大学大学院 歯学府
口腔機能修復学講座 インプラント・義歯補綴学研究分野

九州大学大学院 歯学研究院
口腔機能修復学講座 インプラント・義歯補綴学研究分野
指導教員：古谷野 潔 教授

九州大学大学院 歯学研究院
口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学研究分野
研究指導教員：清島 保 教授

本研究の一部は下記の雑誌に受理された。

Thymosin beta 4 is associated with RUNX2 expression via the Smad and Akt signaling pathways in mouse dental epithelial cells

Hiroataka Someya, Hiroaki Fujiwara, Kengo Nagata, Hiroko Wada, Kana Hasegawa, Yurie Mikami, Akiko Jinno, Hidetaka Sakai, Kiyoshi Koyano and Tamotsu Kiyoshima
International Journal of Molecular Medicine (in press, 2015)

また、本文の内容の一部は下記の学会において発表した。

第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2013 年 9 月 岡山コンベンションセンター ポスター発表

(題名)

マウス歯肉上皮由来角化細胞への Thymosin beta 4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞誘導

略語表

ALZ: alizarin red
ALP: alkaline phosphatase
Ambn: ameloblastin
Amelx: amelogenin, x-linked
 β -GP: beta-glycerophosphate
cDNA: complementary deoxyribonucleic acid
CIM: calcification inducing medium
DAPI: 4, 6-diamidino-2-phenylindole
DMSO: dimethyl sulfoxide
Enam: enamelin
Gapdh: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HE: hematoxylin-eosin
HRP: horseradish peroxidase
kDa: kilo-dalton
Kossa: von Kossa
mDE6: mouse dental epithelial cell line (clone 6)
mRNA: messenger ribonucleic acid
O/N: overnight (16-18 hours)
PBS: phosphate buffered saline
PBS-T: PBS + tween 20
PFA: paraformaldehyde
PMSF: phenylmethanesulfony fluoride
RT: room temperature
Runx2: runt-related transcription factor 2
SDS-PAGE: sodium dodecylsulphate polyacrylamido gel electrophoresis
siRNA: small interfering RNA
TBS-T: tris buffered saline + tween 20
Tb4: thymosin beta 4, x-linked
Tween 20: polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
WB: western blotting

目 次

	頁
1. 要 旨	1
2. 緒 言	3
2-1 : はじめに	3
2-2 : 歯の再生への取り組み	4
2-3 : Tb4 の基礎的事項と歯の発生への関与	5
2-4 : Runx2 の基礎的事項と歯の発生への関与	7
2-5 : 本研究の目的	8
3. 材料と方法	9
3-1 : 細胞培養	9
3-2 : 石灰化誘導培養	9
3-3 : Real-time PCR 法	9
3-4 : Western blotting 法	11
3-5 : ALP 活性測定	12
3-6 : ALZ と von Kossa 染色	13
3-7 : 免疫細胞化学染色	13
3-8 : Runx2 上流シグナル因子の阻害実験	14
3-9 : Runx2 上流シグナル因子阻害条件下における石灰化誘導培養	14
3-10 : Tb4 siRNA 法	14
3-11 : siRNA 法による Tb4 機能抑制下における石灰化誘導培養	15
3-12 : マウス初代口腔扁平上皮細胞の単離と培養	15
3-13 : Tb4 過剰発現細胞 (マウス初代扁平上皮細胞由来)	16
3-14 : 統計解析	16
4. 結 果	17
4-1 : mDE6 細胞における石灰化誘導培養	17
4-1-1 : mDE6 細胞による石灰化様構造物の形成	17
4-1-2 : ALP 活性と歯原性関連因子の mRNA 発現	19
4-1-3 : 歯原性関連因子タンパクの免疫細胞化学染色	20
4-2 : 石灰化誘導培養による Runx2 とその上流シグナル因子の発現	22

4-2-1 : Runx2 の mRNA とタンパク発現.....	22
4-2-2 : Runx2 上流シグナル因子のタンパク発現.....	23
4-3 : Runx2 上流シグナル因子の阻害実験.....	25
4-3-1 : 阻害効果の確認と Runx2 の発現変化.....	25
4-3-2 : 歯原性関連因子の mRNA 発現と石灰化様構造物の形成変化.....	27
4-4 : siRNA 法による Tb4 機能抑制実験.....	29
4-4-1 : Tb4 機能抑制効果の確認と Runx2 の発現変化.....	29
4-4-2 : Tb4 機能抑制下石灰化誘導培養による石灰化様構造物の形成変化.....	31
4-4-3 : Tb4 機能抑制下における Runx2 上流シグナル因子のタンパク発現.....	32
4-5 : マウス初代口腔扁平上皮細胞由来 Tb4 過剰発現細胞の解析.....	34
4-5-1 : マウス初代口腔扁平上皮細胞の単離と培養.....	34
4-5-2 : Tb4 過剰発現細胞の作製.....	35
4-5-3 : Tb4 過剰発現細胞における歯原性関連因子の mRNA 発現.....	36
4-5-4 : Tb4 過剰発現細胞における歯原性関連因子タンパクの免疫染色.....	37
5. 考 察.....	38
6. 総 括.....	46
7. 謝 辞.....	48
8. 参考文献.....	49

1. 要 旨

口腔病理学研究室では、歯の発生における Thymosin beta 4, X-linked (Tb4) の機能について研究を行ってきた。これまでの研究により、Tb4 が歯原性上皮細胞において Runt-related transcription factor 2 (Runx2) の発現を調節することによって、歯の発育や基質の形成に関与している可能性が予想された。しかし、Tb4 による Runx2 の発現調節メカニズムの詳細はよく分かっていない。そこで、本研究では歯原性上皮細胞株において Tb4 が Runx2 の発現を調節する分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

1. マウス歯原性上皮細胞株 (mDE6 細胞) の実験材料としての有用性を確認するため、21 日間の石灰化誘導培養を行った。石灰化誘導 7 日目より Alizarin red (ALZ) と von Kossa (Kossa) 染色陽性像を呈する石灰化様構造物の形成を認め、その量は経時的に増大した。また非誘導群に比べて誘導群では、Amelogenin, X-linked (Amelx)、Ameloblastin (Ambn) および Enamelin (Enam) などの歯原性関連因子の mRNA 発現の増加を認めた。さらに、免疫細胞化学染色により石灰化様構造物形成部位に歯原性関連因子のタンパク発現を認めた。
2. mDE6 細胞の石灰化誘導培養において、非誘導群に比べて誘導群で有意に Runx2 の発現が増加していた。そこで、Runx2 上流に位置する Smad、MAPK、PI3K-Akt および Wnt/ β -catenin 経路のタンパク発現を検索した。誘導開始時と非誘導 21 日目に比べて誘導 21 日目ではリン酸化 Smad1/5 (p-Smad1/5) のタンパク発現が有意に増加していた。さらに、Smad1/5/8 と Akt のリン酸化

阻害剤添加により Runx2 のタンパク発現は減少した。阻害剤添加条件下で石灰化誘導培養を行うと濃度依存的に石灰化様構造物形成の減少を認めた。

3. mDE6 細胞において Tb4 による Runx2 の発現調節に Smad や PI3K-Akt 経路が関わっているかを検討するため、siRNA 法による Tb4 機能抑制下での Runx2 とその上流シグナル因子の発現検索を行った。siRNA 未処理群と Universal negative control siRNA 処理群に比べて siRNA 処理群で Runx2 の mRNA とタンパク発現の減少を認めた。さらに、p-Smad1/5 と p-Akt のタンパク発現も減少していた。
4. 将来的に我々はヒトの歯肉上皮細胞を採取し、Tb4 を遺伝子導入することで歯原性上皮細胞を作製することを目指している。そのためにマウス歯肉と口蓋より口腔扁平上皮細胞を単離・培養し、Tb4 遺伝子導入により歯原性関連因子の発現が認められるかを検討した。未導入細胞に比べて Tb4 過剰発現細胞においては Amelx、Ambn および Enam の mRNA 発現を認め、免疫細胞化学染色においても AMELX と AMBN のタンパク発現を認めた。

以上より、mDE6 細胞では石灰化誘導培養と阻害実験により Smad や PI3K-Akt 経路を介して Runx2 の発現が調節され、エナメル基質を含む石灰化様構造物形成することを確認した。そして、Tb4 は Smad1/5/8 や Akt のリン酸化に影響を与えることで Runx2 の発現や石灰化様構造物の形成に関与している可能性が示唆された。また、マウス初代口腔扁平上皮細胞においても Tb4 の過剰発現により歯原性上皮様細胞に形質転換する可能性が示唆された。

2. 緒 言

2-1 : はじめに

現在、我が国は超高齢社会といわれ、内閣府が発表している平成 26 年度版高齢社会白書によると、平成 25 年の高齢化率は 25.1%に達しており、さらに増加し続けている。このような社会環境の中、高齢者が自立して健康な生活を送ることができる期間をいかに伸ばすかが社会的に重要な課題となっている。

高齢者が健康に過ごすために、口腔領域の審美性や咀嚼・嚥下機能の維持・回復は高齢者の健康増進にとって重要なテーマであり、この点において歯科医療が果たす役割は大きい (Akagawa et al., 2012)。特に、高齢者の多くは定期的に歯科医院を受診するという習慣がないため、う蝕・歯周病に罹患した状態で歯科を受診するケースが多く、歯を喪失するリスクも高いと考えられる。

歯を喪失した場合の治療法としては、ブリッジや義歯、そして歯科用インプラント (インプラント) による補綴治療が行われている。歯科医療は欠損した組織を補綴する技術が発達しており、いずれの補綴治療も確立された手技となっている。その中でも、近年のインプラント治療の発展は目覚ましいものがある。1983 年にブローネマルクらがチタンと骨が結合すること (オッセオインテグレーション) を報告 (Brånemark et al., 1983) して以降、歯の欠損に対する補綴治療として、日常的に選択される治療法の 1 つとなっている。

しかし、臨床応用されているインプラントには歯根膜が存在しないため、歯根膜によって与えられる繊細な触・圧覚や振動感覚を回復させることはできていない。また、インプラント治療が普及するに従い、インプラント周囲の歯周組織にプラークが付着し、炎症が生じるインプラント周囲炎も増加している

(Fransson et al., 2005, 2008; Lang et al., 2011)。

そこで、歯の欠損に対する再生歯による治療が可能になれば、歯根膜感覚の回復に加えて生体防御の観点からも現在のインプラント治療より優れた治療になると考えている。

2-2：歯の再生への取り組み

歯の再生には、細胞、成長因子、そして足場の存在が必要である。これまでの研究によりマウス歯胚を採取し、歯胚上皮成分と間葉成分に分け *in vitro* で再構築し、歯のもととなる器官（器官原基）の作製後にマウス腎皮膜下に移植することで歯の再生が可能であることが報告された (Nakao et al., 2007; Ikeda et al., 2009)。しかし、倫理的な観点からヒト歯胚を採取し、歯の再生を行うことは困難である。したがって、器官原基法を用いれば理論的には歯の再生が可能であるが、それにはエナメル質を形成する歯原性上皮細胞と象牙質、セメント質、歯根膜、そして歯髄を形成する歯原性間葉細胞の調達が必要である。

歯原性間葉細胞については歯髄内に幹細胞が存在し、誘導することで幹細胞から歯原性間葉細胞に分化することが報告されている (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003; Shi et al., 2005; Sonoyama et al., 2006)。一方、歯原性上皮細胞については、歯の萌出後、歯胚上皮由来の幹細胞が消失してしまうため、その作製は困難であると考えられる。最近の研究において、マウス由来人工多能性幹細胞がラット由来歯胚上皮細胞株との共培養によりエナメル芽細胞に分化誘導されることが報告された (Arakaki et al., 2012)。しかし、人工多能性幹細胞は癌化の可能性もあり、歯の再生治療に応用するためには克服しなければならない

問題も多い。

そこで、我々は歯の発生において胎生 12 日齢のマウス下顎に差異的に発現し (Yamaza et al., 2001)、歯堤の形成から鐘状期にかけて主に歯胚上皮や内外エナメル上皮に発現し基質の分泌に関与している可能性がある Tb4 に着目した (Akhter et al., 2005)。そして、ヒト非歯原性上皮細胞への Tb4 の遺伝子導入による歯原性上皮細胞の作製に取り組んできた (Kiyoshima et al., 2014)。

2-3 : Tb4 の基礎的事項と歯の発生への関与

Tb4 は β -thymosin family に属する 43 個のアミノ酸からなる 4.9 kDa のペプチドである。Tb4 は β -thymosin 量の 70–80%を占めており、最も豊富に存在している (Huff et al., 2001; Hannappel et al., 2003)。Tb4 の主な機能は、G アクチンと 1:1 で結合し複合体を形成し、F アクチンへの重合を阻害することである (Hannappel et al., 2003; Remedios et al., 2003)。その他、皮膚や角膜の創傷治癒促進 (Malinda et al., 1999; Sosne et al., 2001, 2002; Philp et al., 2003)、血管新生の促進 (Grant et al., 1995; Malinda et al., 1997; Grant et al., 1999)、腫瘍細胞の浸潤や転移への関与 (Cha et al., 2003) などが報告されている。このように Tb4 は G アクチンの重合調節をはじめ多様な機能を有していると考えられる (Fig. 1)。

当研究室の研究以外において、これまでに Tb4 を過剰発現させた遺伝子改変マウスにおいてエナメル質の低形成を示すことが報告された (Cha et al., 2010)。また、ヒト歯髄細胞株において siRNA 法により Tb4 の機能を抑制したところ、Smad や MAPK 経路を介して Runx2 の発現が抑制され石灰化能の減弱を認めることが報告された (Lee et al., 2013)。しかし、Tb4 と歯の発生との関与について

の報告は少ない。

そこで、当研究室では Tb4 と歯の発生との関与について研究を行ってきた。Tb4 の発現は、主に歯胚上皮やエナメル基質分泌期の内エナメル上皮細胞基底側に認められる (Akhter et al., 2005; Shiotsuka et al., 2013)。また、歯の発生における Tb4 の機能解析を目的に Antisense sulfur-substituted ODN 法による Tb4 機能抑制下に、歯胚を 8 日間器官培養したところ、胎生 11.0 日齢の歯胚の発育は阻害され帽状期のまま発育は停止し、歯胚の type II/III Runx2 の発現も抑制されていた (Ookuma et al., 2013)。さらに、Tb4 をヒト皮膚由来角化細胞株に遺伝子導入し、Tb4 過剰発現細胞株を作製したところ Runx2 の発現が増加し、歯原性上皮細胞様の性質を有するようになることを報告した (Kiyoshima et al., 2014)。

これらの報告より、Tb4 は Runx2 を介して歯胚の発育や基質の形成、そして石灰化に関与していることが予想された。

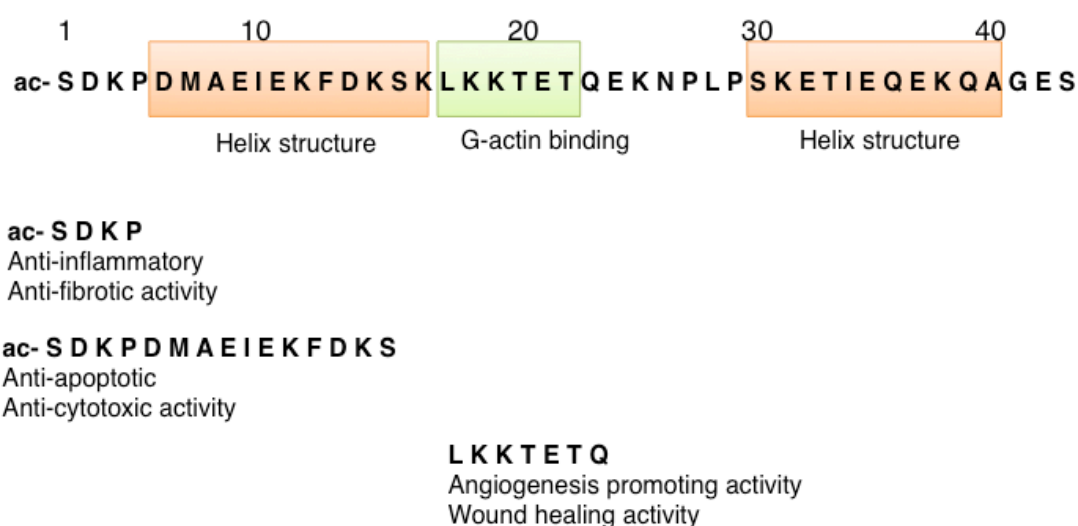


Fig. 1 Tb4 のドメイン構造とその生物学的活性

図中の大文字アルファベットはアミノ酸の略号を示す。(図：Sosne et al., 2010 より引用改変)

2-4 : Runx2 の基礎的事項と歯の発生への関与

Runx2 は骨芽細胞分化や骨組織の成熟に必要な不可欠な転写因子であり、鎖骨頭蓋異形成症における責任遺伝子として知られている (Mundlos et al., 1997; Komori et al., 1997; Ducy et al., 1997)。現在、Runx2 はマウスにおいて type I から III までの 3 つの isoform が存在し、その違いは転写時のプロモーター領域の違いによることが報告されている (Xiao et al., 1998; Banerjee et al., 2001)。type I Runx2 は骨組織以外の多くの組織でも認め、type II/III Runx2 は主に骨組織に認められ、歯の発生においても重要な働きをしていることが報告されている (Camilleri et al., 2006; Chen et al., 2009)。

Runx2 と歯の発生に関するこれまでの研究として、Runx2 欠損マウスでは臼歯の発達が帽状期初期で停止すること、また前歯においてはエナメル質の欠失を認めることが報告された (D'souza et al., 1999)。さらに、エナメル芽細胞の特異的マーカーとして知られる *Ambn* のプロモーター領域に Runx2 結合領域が 2 ヶ所存在し、その部位を変異させると *Ambn* のプロモーター活性が消失することが報告された (Dhamija et al., 2001)。

当研究室においても、type II/III Runx2 の機能抑制により器官培養下の胎生 11.0 日齢歯胚において発育阻害を認め、胎生 15.0 日齢歯胚ではエナメル芽細胞と象牙芽細胞の分化が阻害され正常な基質形成が行われなかったことを報告した (Kobayashi et al., 2006)。これらの報告より、Runx2 は *Amelx* や *Ambn* などの発現調節を介し、歯の形成にも関与していると考えられた。

一方、Runx2 自体の発現調節には、骨芽細胞において Smad、MAPK、PI3K-Akt および Wnt/ β -catenin 経路など様々なシグナル経路を介して調節されることが報

告されている (Martin et al., 2011)。また、Tb4 が心筋細胞や歯髄細胞において Akt や Smad 経路の活性化に関与していることが報告されている (Bock-Marquette et al., 2004; Lee et al., 2013)。しかし、歯原性上皮細胞における Tb4 による Runx2 の発現調節に関与するシグナル経路についての報告はない (Fig. 2)。

2-5 : 本研究の目的

そこで、本研究ではマウス歯原性上皮細胞株を用い Tb4 による Runx2 の発現調節に関与するシグナル経路の検索を行い、マウス初代口腔扁平上皮細胞への Tb4 遺伝子導入による効率的な歯原性上皮細胞作製の一助とすることを目的とした。

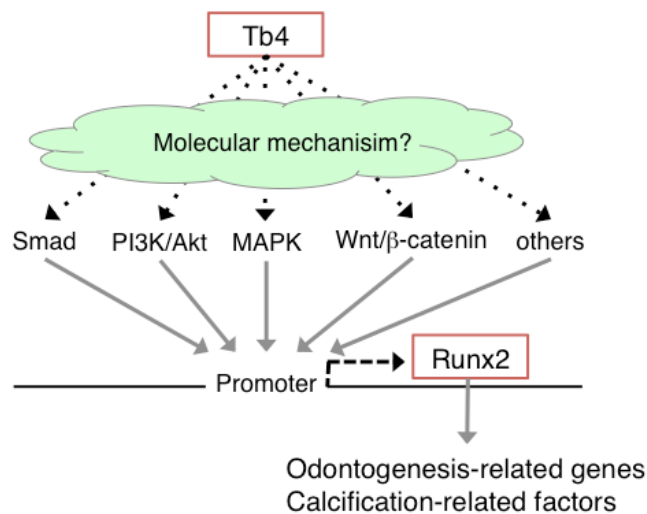


Fig. 2 研究背景と目的

黒点線矢印 : Tb4 から Runx2 までのシグナル経路でこれまでに報告がない経路を示す。

灰色実線矢印 : すでに他の研究において報告されている経路を示す。

3. 材料と方法

3-1 : 細胞培養

マウス歯胚上皮より採取し株化したマウス歯原性上皮細胞株 (mDE6 細胞、東北大学・福本敏教授より供与) を 10% Fetal bovine serum (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)、1% Penicillin (50 units/ml) -Streptomycin (50 µg/ml) 含有 DMEM/F-12 medium (Life Technologies) にて 37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。

3-2 : 石灰化誘導培養

mDE6 細胞を φ 35-mm dish に播種し、細胞密度がほぼコンフルエント状態になったところで DMEM/F12 medium (Life Technologies) に最終濃度が 50 µg/ml Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) と 10 mM β-glycerolphosphate (β-GP) (Sigma-Aldrich) となるよう添加した石灰化誘導培地 (Calcification inducing medium, CIM) で 21 日間培養した。コントロールとして Ascorbic acid と β-GP を含まない培地で培養した石灰化非誘導群を準備した。培地は 3 日毎に交換し、誘導開始時、誘導 7 日および 21 日目で試料を回収した。解析には Real-time PCR 法、Western blotting (WB) 法、Alkaline phosphatase (ALP) 活性測定、Alizarin red (ALZ)、von Kossa (Kossa) 染色および免疫細胞化学染色を用いた。

3-3 : Real-time PCR 法

回収した細胞溶解液より SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) にて Total RNA を精製した。Total RNA より SuperScript® VILO™ cDNA

Synthesis Kit and Master Mix (Life Technologies) にて cDNA を合成した。

Real-time PCR 法には、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara, Shiga, Japan)、PCR Forward/Reverse primers (各 0.4 μM) および DNA template を調整し PCR 反応液として用いた。Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara) を用いて、シヤトル PCR 標準プロトコル (初期変性 : 95°C・30 秒、2 ステップ〈40 サイクル〉 : 95°C・5 秒、60°C・30 秒) に従い、PCR を行った。Real-time PCR 法の解析には、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) の Cycle threshold (CT) 値を用いて、それぞれの標的遺伝子の CT 値を補正し、 $\Delta\Delta$ CT法により相対定量を行った。Real-time PCR 法に使用した Primer 配列を Table 1 に示す。

Table 1 : Real-time PCR 法に使用したプライマー配列

Gene name	Accession number	Sequence
Gapdh	NM_001289726.1	Forward: 5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3'
	NM_008084.3	Reverse: 5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3'
Tb4	NM_021278.2	Forward: 5'-CTG ACA AAC CCG ATA TGG CTG A-3'
		Reverse: 5'-ACG ATT CGC CAG CTT GCT TC-3'
Runx2	NM_001271627.1	Forward: 5'-GGT TAA TCT CTG CAG GTC ACT ACC A-3'
	NM_009820.5	Reverse: 5'-ACG GTG TCA CTG CGC TGA A-3'
	NM_001146038.2	
Amelx	NM_009666.4	Forward: 5'-AGC ATC CCT GAG CTT CAG ACA GA-3'
		Reverse: 5'-AAC CAG GGC TTC CAG GAT GAG-3'
Ambn	NM_009664.1	Forward: 5'- CCT GGG AGC ACA GTG AAT GTC-3'
		Reverse: 5'-TCA AAC TAG CCA TGC CAG GAG-3'
Enam	NM_017468.3	Forward: 5'-CCG AAT GCC TGG ATT TAG CAG TA-3'
		Reverse: 5'-GGG TTG CTG CCA TCC ATT G-3'

Gene name、Accession number、Sequence に関する情報は NCBI データベースより取得

3-4 : Western blotting 法

タンパクの回収には、各種タンパク分解酵素阻害剤（2% Protease inhibitor cocktail 〈Sigma-Aldrich〉、20 mM Lactacystin、25 mM β -GP、1 mM PMSF および 1 mM Sodium orthovanadate）を添加した RIPA buffer (Sigma-Aldrich) を使用した。細胞溶解液の回収では、タンパク分解酵素の作用を抑制するために 4°C に冷やした PBS (-) で洗浄し、上記 RIPA buffer を細胞に滴下した。氷上にて 10 分間放置した後、セルスクレーパーにて細胞溶解液を回収した。回収した細胞溶解液は遠心分離後 (8,000 xg、10 分間、4°C)、上清を回収し、さらに遠心分離 (10,000 xg、5 分間、4°C) を行った。この上清を WB 用の試料として使用した。10 μ g 量の試料に等量の Electrophoresis sample buffer (Sigma-Aldrich) を混合し、95°C で 5 分間加熱し、タンパク変性を起こさせた後に 10%または 15%ゲルにて SDS-PAGE を行った。その後、100%メタノールにて親水化処理した Polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にタンパクを転写した。

5% BSA または 5%スキムミルクにてブロッキング後（1時間、RT）、一次抗体反応（1時間、RT または O/N、4°C）を行った。TBS-T にてメンブレンを洗浄し（10分間、3回）、HRP 標識二次抗体を用いて反応（1時間、RT）させ、TBS-T にてよく洗浄した（10分間、5回）。検出には ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を使用し、冷却 CCD イメージャー ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare) にて撮影を行った。同一メンブレンにて他のタンパクを検出するため、必要に応じてリプローブを行った。GAPDH のバンド強度により標的タンパクのバンド強度を補正し、比較定量した。

使用した一次抗体を Table 2 に示す。

Table 2 : WB 法に使用した一次抗体

Target protein	Provider ID	Antibody	Dilution
GAPDH	SC20357	Goat Polyclonal IgG	1:1000
TB4	SC67114	Rabbit Polyclonal IgG	1:1000
RUNX2	AB76956	Mouse Monoclonal IgG	1:1000
Smad1/5/8	SC6031	Rabbit Polyclonal IgG	1:1000
p-Smad1/5	CST9516	Rabbit Monoclonal IgG	1:2000
ERK1	BD610030	Mouse Monoclonal IgG	1:8000
p-ERK1/2	BD612358	Mouse Monoclonal IgG	1:4000
Akt	CST4691	Rabbit Monoclonal IgG	1:2000
p-Akt	CST4060	Rabbit Monoclonal IgG	1:2000
β -catenin	CST9582	Rabbit Monoclonal IgG	1:4000

AB : Abcam® (Cambridge, UK)

BD : Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA)

CST: Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA)

SC : Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)

3-5 : ALP 活性測定

前項 3-4 に準じてタンパク試料を回収し、p-ニトロフェニルリン酸基質法を利用した ALP 活性測定キットであるラボアッセイ™ALP (Wako, Osaka, Japan) を使用し、メーカープロトコルに従い ALP 活性を測定した。吸光度の測定には、マイクロプレートリーダー-infinite® 200 PRO (Tecan, Männedorf, Schweizerische) を使用した。

3-6 : ALZ と von Kossa 染色

石灰化様構造物の形成を確認するため、ALZ と Kossa 染色を行った。細胞を PBS (-) にて洗浄し、4% PFA (Merck, Daemstadt, Germany) で固定 (30 分間、RT) した。固定後に蒸留水にて洗浄し、1% ALZ 溶液または 5% 硝酸銀溶液を用いて通法に従い、染色を行った。

3-7 : 免疫細胞化学染色

試料を PBS (-) にて 2 回洗浄し、4% PFA にて固定 (30 分間、RT) した。固定後に、PBS (-) にて洗浄し (5 分間、3 回)、PBS-T にて膜透過処理 (30 分間、RT) を行った。10%ヤギ血清またはウサギ血清 (Nichirei Bioscience Inc, Tokyo, Japan) にてブロッキング後、Table 3 に示す抗体にて一次抗体反応を行った (O/N、4°C)。PBS-T にて洗浄 (5 分間、3 回) し、Alexa fluor 488 goat anti rabbit IgG または Alexa fluor 488 rabbit anti goat IgG (Life Technologies) を用いて遮光下にて二次抗体反応を行った (1 時間、RT)。PBS-T にてよく洗浄し (10 分間、3 回)、4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) による核染色後に Vectorshield (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) にて封入し、倒立型顕微鏡 IX71 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) と顕微鏡用カメラ DP72 (OLYMPUS) にて撮影を行った。

Table 3 : 免疫細胞化学染色法に使用した一次抗体

Target protein	Provider ID	Antibody	Dilution
AMELX	SC20357	Rabbit Polyclonal IgG	1:500
AMBN	SC33100	Goat Polyclonal IgG	1:500
ENAM	SC33107	Goat Polyclonal IgG	1:500

3-8 : Runx2 上流シグナル因子の阻害実験

Smad1/5/8 リン酸化阻害剤である LDN193189 (Adooq BioScience, Irvine, USA)、Akt リン酸化阻害剤である Triciribine (Wako) を使用した。阻害剤の溶解には Dimethyl sulfoxide (DMSO, Wako) を用い、培地添加時の DMSO 最終濃度が 0.1 % (v/v) になるように調整した。mDE6 細胞を ϕ 35-mm dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、48 時間後に阻害剤を添加した。阻害剤添加 48 時間後に試料を回収し、Real-time PCR 法と WB 法により解析した。阻害剤の最終濃度は、それぞれ LDN193189 が 50 と 500 nM、Triciribine が 250 と 2500 nM とした。コントロールとして DMSO のみを添加した試料を準備した。

3-9 : Runx2 上流シグナル因子阻害条件下における石灰化誘導培養

前項 3-8 に準じて細胞播種、阻害剤添加を行った。細胞播種 48 時間後に石灰化誘導培養を開始した。阻害剤を添加した CIM は 2 日毎に交換し、石灰化誘導 10 日目に試料を回収し ALZ 染色により解析を行った。

3-10 : Tb4 siRNA 法

Tb4 mRNA と相補的な塩基配列を有する Tb4 siRNA を 3 種類設計し (siRNA-1、-2、-3)、使用した。mDE6 細胞を ϕ 35-mm dish に 2×10^5 cells/dish で播種した。播種 24 時間後に 60-80 % コンフルエントになっていることを確認し、Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Life Technologies) を用いてメーカープロトコルに従い Tb4 siRNA を導入した (siRNA 最終濃度 : 10 nM)。siRNA 処理 48 時間後に試料を回収し、Real-time PCR 法と WB 法により解析した。

コントロールとして、siRNA 未処理群 (Ut 群) と Universal negative control siRNA (Sigma-Aldrich) 処理群 (Cont 群) を準備した。

3-11 : siRNA 法による Tb4 機能抑制下における石灰化誘導培養

前項 3-10 に準じて細胞播種と Tb4 siRNA 処理を行った。siRNA 処理 48 時間後に石灰化誘導培養を開始した。Tb4 siRNA を添加した CIM の交換は 2 日毎に行った。石灰化誘導 10 日目に試料を回収し、ALZ 染色により石灰化の程度を解析した。

3-12 : マウス初代口腔扁平上皮細胞の単離と培養

「九州大学動物実験規則」に従い、イソフルランにて吸入麻酔を行い、無痛下にて生後 2-3 週齢の BALB/c 雄マウス (Charles River Laboratories, Yokohama, Japan) を屠殺した。屠殺後、上下顎臼歯部歯肉と口蓋を歯周組織と一塊に採取した。採取した組織片は 2 units/ml Dispase 溶液 (Life Technologies) により 4°C、O/N で処理し、結合組織からシート状の上皮組織を分離した。分離した上皮組織のみを 0.25% Trypsin 溶液で 37°C、5 分間処理し、メスにて細かく組織を刻み、Human keratinocyte growth supplement (Life Technologies) を添加した EpiLife® medium (EpiLife; Life Technologies) を Trypsin 溶液の 2 倍量加えた。さらに、ポアサイズが 100 μm のセルストレーナー (Beckton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて組織をフィルトレーションし、遠心分離後 (300 xg、5 分間) に EpiLife を 2ml 加えて懸濁し、単離させた細胞を 37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。

3-13 : Tb4 過剰発現細胞（マウス初代口腔扁平上皮細胞由来）

Tb4 コード領域の前後に制限酵素認識部位（HindIII・BamH I）を付加した DNA 構造物を増幅し、上記制限酵素により切断後、発現ベクター-pcDNA3.1 (+) のマルチクローニングサイトに組み込んだ。本ベクターを pcDNA3.1 (+) /Tb4 ベクター（Tb4 発現ベクター）とする。Tb4 発現ベクターを Lipofectamine® LTX and PLUS™ Reagent（Life Technologies）を使用し、メーカープロトコルに従い、マウス初代口腔扁平上皮細胞へ遺伝子導入した。100 µg/ml Geneticin（Life Technologies）含有 EpiLife で 2 週間培養し、Tb4 ベクターが導入された細胞を選択的にクローニングし、Real-time PCR 法により Tb4 の mRNA 発現を解析した。

Tb4 過剰発現細胞を播種し、セミコンフルエント状態の細胞を試料として回収し、Real-time PCR 法と免疫細胞化学染色により解析した。コントロール群としてベクター未導入のマウス初代口腔扁平上皮細胞（Ut）と pcDNA3.1 (+) を遺伝子導入した細胞（Mock）を準備した。

3-14 : 統計解析

統計解析には一元配置分散分析を用い Tukey-Kramer 法にて多重比較検定を行った。すべての実験は独立に 3 回以上行った。

4. 結 果

4-1 : mDE6 細胞における石灰化誘導培養

石灰化誘導培養を行い、mDE6 細胞が基質や石灰化様構造物の形成などの歯原性上皮細胞としての性質を有しているかを確認した。mDE6 細胞の石灰化能と歯原性関連因子の発現を確認するため ALZ 染色、Kossa 染色、ALP 活性測定、Real-time PCR および免疫細胞化学染色を行った。

4-1-1 : mDE6 細胞による石灰化様構造物の形成

石灰化誘導開始時、誘導 7 日および 21 日目で試料を回収し、ALZ と Kossa 染色を行った。両染色において石灰化様構造物の形成を確認した。石灰化誘導群 (CIM+) では誘導 7 日目より石灰化様構造物の形成を認め、誘導 21 日目にその範囲は増大した。一方、石灰化非誘導群 (CIM-) ではいずれの時期においても石灰化様構造物の形成を認めなかった (Fig. 3A, B)。

さらに、位相差顕微鏡により同一視野で石灰化様構造物形成部位を観察したところ、誘導 3 日目より細胞が密に集積した部位に基質と思われる構造物を認め、時間経過とともにその大きさは増大した (Fig. 3Ca-c)。誘導 21 日目に Kossa 染色によりその構造物が石灰化していることを確認した (Fig. 3Cd)。

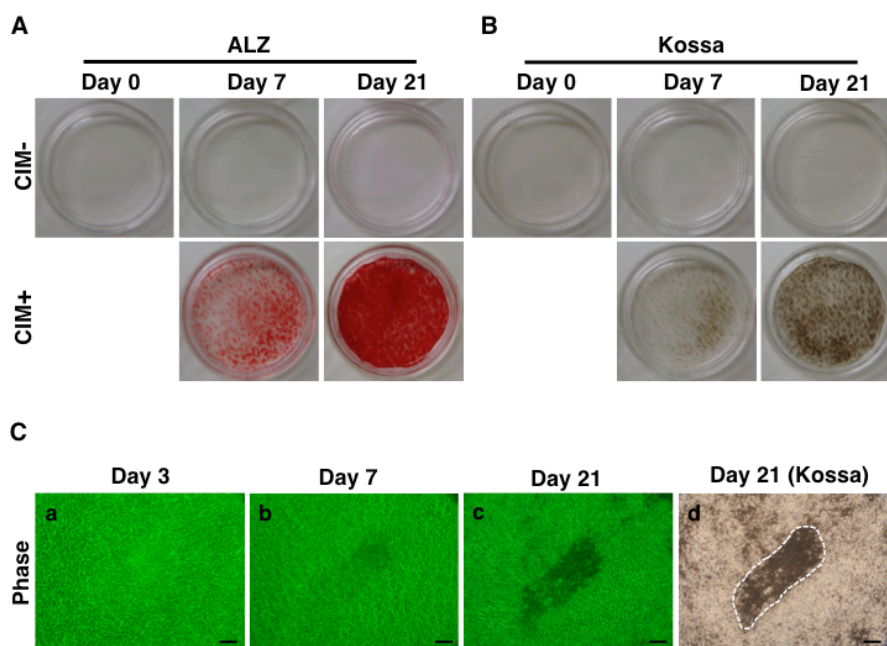


Fig. 3 石灰化様構造物形成の経時的変化

A, B : CIM-ではいずれの時期においても染色陽性像を認めなかった (上段)。

CIM+では Day 7 より ALZ (A) および Kossa 染色 (B) 陽性像を認め Day 21 においてその面積は増大した (下段)。

C : 位相差顕微鏡像における同一視野での経時的な基質の増大を示した (a-c)。Day 21 の Kossa 染色像での石灰化様構造物を白点線囲み枠で示す (d)。

CIM+ : 石灰化誘導群、CIM- : 石灰化非誘導群、Day 0 : 石灰化誘導開始時、Day 3 : 石灰化誘導 3 日目、Day 7 : 石灰化誘導 7 日目、Day 21 : 石灰化誘導 21 日目

Scale bars: 200 μ m

4-1-2 : ALP 活性と歯原性関連因子の mRNA 発現

石灰化形成能の指標となる ALP 活性を測定したところ、誘導開始時と非誘導 21 日目に比べて誘導 21 日目では約 8 倍程度まで活性が増加していた (Fig. 4A)。

誘導開始時、非誘導および誘導 21 日目における歯原性関連因子 (Amelx、Ambn および Enam) の mRNA 発現を Real-time PCR 法により検索した。誘導開始時と非誘導 21 日目に比べて誘導 21 日目で Amelx の mRNA 発現は約 4 倍、Ambn では約 3 倍になり、有意な増加を認めた (Fig. 4B, C)。Enam の発現では、有意差を認めなかったが、誘導 21 日目において増加傾向を示した (Fig. 4D)。

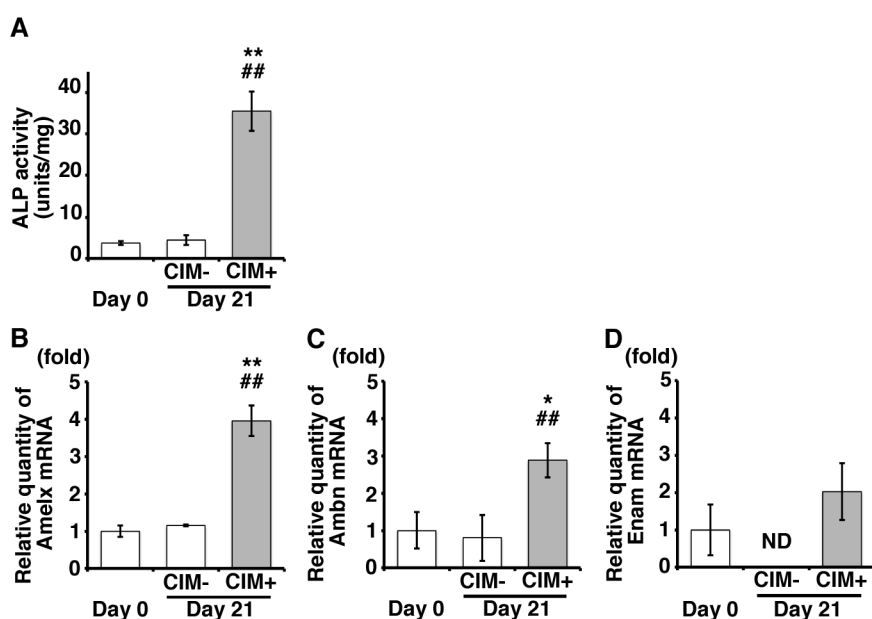


Fig. 4 ALP 活性と歯原性関連因子の mRNA 発現変化

A : ALP 活性測定結果を示す。Day 0 と Day 21 CIM- に比べて Day 21 CIM+ では ALP 活性が有意に増加していた。

B-D : 歯原性関連因子の mRNA 発現を示す。Day 0 と Day 21 CIM- に比べて Day 21 CIM+ において Amelx、Ambn の有意な発現増加を認めた。Enam の発現は増加傾向を認めた。

ND : not detectable

(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ は Day 0、## $p < 0.01$ は Day 21 CIM- に対する有意差を示す)

4-1-3：歯原性関連因子タンパクの免疫細胞化学染色

非誘導と誘導 21 日目の基質形成部位における歯原性関連因子のタンパク発現を検索するため、免疫細胞化学染色を行った。誘導群では、AMELX、AMBN および ENAM タンパクの染色陽性像を認めたが (Fig. 5Ag-i)、非誘導群ではいずれの因子においても明らかな陽性像を認めなかった (Fig. 5Aa-c)。免疫細胞化学染色後に基質形成部位の石灰化を確認するために、Kossa 染色を行ったところ、誘導群においてのみ歯原性関連因子のタンパク陽性像と同一部位に Kossa 染色陽性像を認めた (Fig. 5Ad-f, j-l)。さらに、石灰化誘導 21 日目の mDE6 細胞を強拡大にて観察したところ、細胞質に顆粒状に染色された陽性像を認めた (Fig. 5Bd-f)。

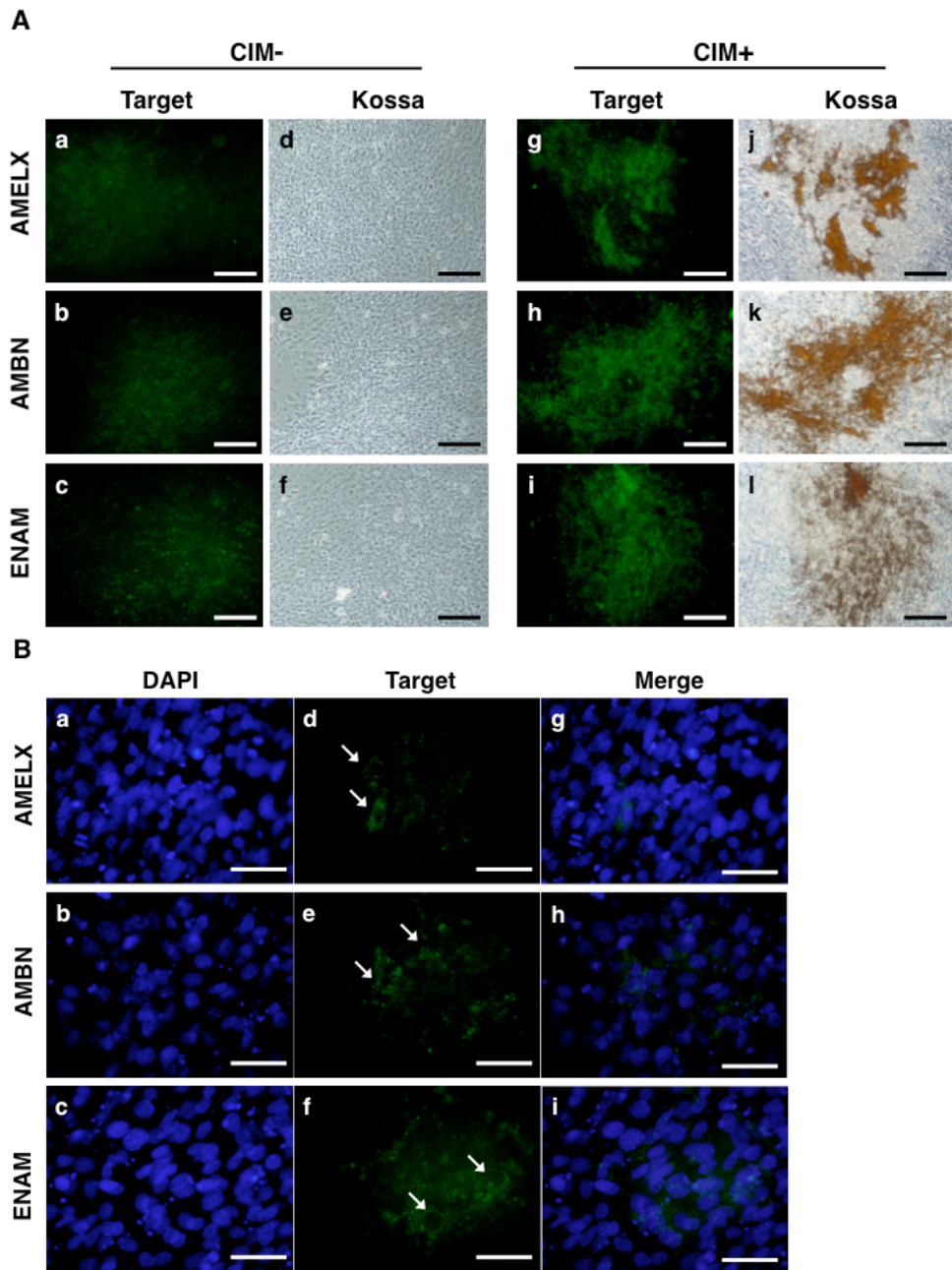


Fig. 5 石灰化誘導培養 21 日目における歯原性関連因子タンパクの免疫染色像

A : CIM-では、基質形成部位において AMELX、AMBN および ENAM の弱い発現を認めた (a-c)。

Kossa 染色ではいずれの因子も陽性像を認めなかった (d-f)。

一方、CIM+では基質形成部位において強い AMELX、AMBN および ENAM の発現を認めた (g-i)。Kossa 染色により同部位に陽性像を認めた (j-l)。

B : CIM+の mDE6 細胞の強拡大像を示す。いずれの因子も細胞質に顆粒状の染色陽性像を認めた (d-f 白矢印)。

Scale bars: 200 μ m (A)、50 μ m (B)

4-2 : 石灰化誘導培養による Runx2 とその上流シグナル因子の発現

mDE6 細胞は歯原性上皮細胞としての性質を有していることを確認した。そこで、mDE6 細胞の基質形成や石灰化に影響を与えていると考えられる Runx2 の発現変化を検索した。さらに、Runx2 の上流に位置する Smad、PI3K-Akt、MAPK および Wnt/ β -catenin 経路を代表するシグナル因子、Smad1/5/8、p-Smad1/5、Akt、p-Akt、ERK1、p-ERK1/2 および β -catenin のタンパク発現変化を WB 法により解析した。

4-2-1 : Runx2 の mRNA とタンパク発現

石灰化誘導 21 日目の Runx2 の mRNA 発現は、誘導開始時に比べて約 5 倍、非誘導 21 日目に比べて約 2.5 倍になり、有意に増加していた (Fig. 6A)。タンパクレベルにおいても、誘導 21 日目において誘導開始時と非誘導 21 日目に比べて約 3 倍になり、有意に増加していた (Fig. 6B)。

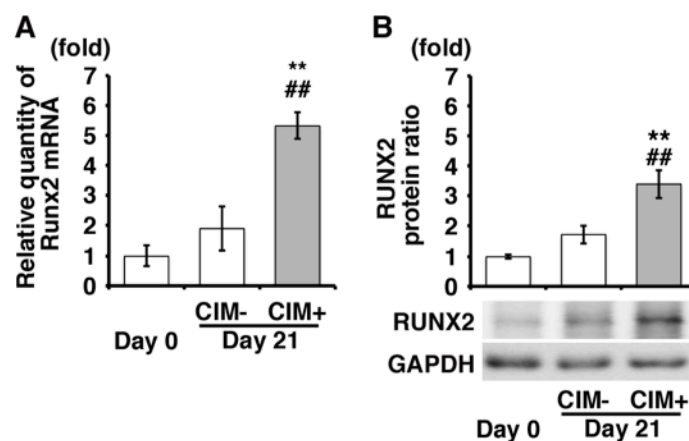


Fig. 6 mDE6 細胞の石灰化誘導培養における Runx2 の mRNA とタンパク発現変化

A : Runx2 の mRNA 発現は Day 0 と Day 21 CIM- に比べて Day 21 CIM+ で有意な増加を認めた。

B : Runx2 のタンパク発現は mRNA 発現と同様に Day 21 CIM+ において有意な増加を認めた。

(** $p < 0.01$ は Day 0、## $p < 0.01$ は Day 21 CIM- に対する有意差を示す)

4-2-2 : Runx2 上流シグナル因子のタンパク発現

p-Smad1/5 のタンパク発現は、石灰化誘導 21 日目において誘導開始時に比べて約 2 倍、非誘導 21 日目に比べて約 1.5 倍になり、有意に増加していた。Smad1/5/8 のタンパク発現は、誘導開始時に比べて非誘導 21 日目と誘導 21 日目において有意差を認めなかったが、ともに約 1.6 倍になり増加していた (Fig. 7A)。

p-Akt のタンパク発現は、誘導開始時に比べて非誘導 21 日目で約 1.5 倍、誘導 21 日目で約 1.8 倍になり、有意に増加していた。誘導群と非誘導群間で有意差を認めなかった。Akt のタンパク発現に著明な変化は認められなかった (Fig. 7B)。

p-ERK1/2 のタンパク発現は、誘導開始時と非誘導 21 日目に比べて誘導 21 日目で有意差を認めなかったが、約 0.8 倍に減少していた。ERK1 のタンパク発現は、誘導開始時と非誘導 21 日目に比べて誘導 21 日目で約 0.5 倍になり、有意に減少していた (Fig. 7C)。

β -catenin のタンパク発現は、誘導開始時、非誘導および誘導 21 日目において発現量に著明な変化を認めなかった (Fig. 7D)。

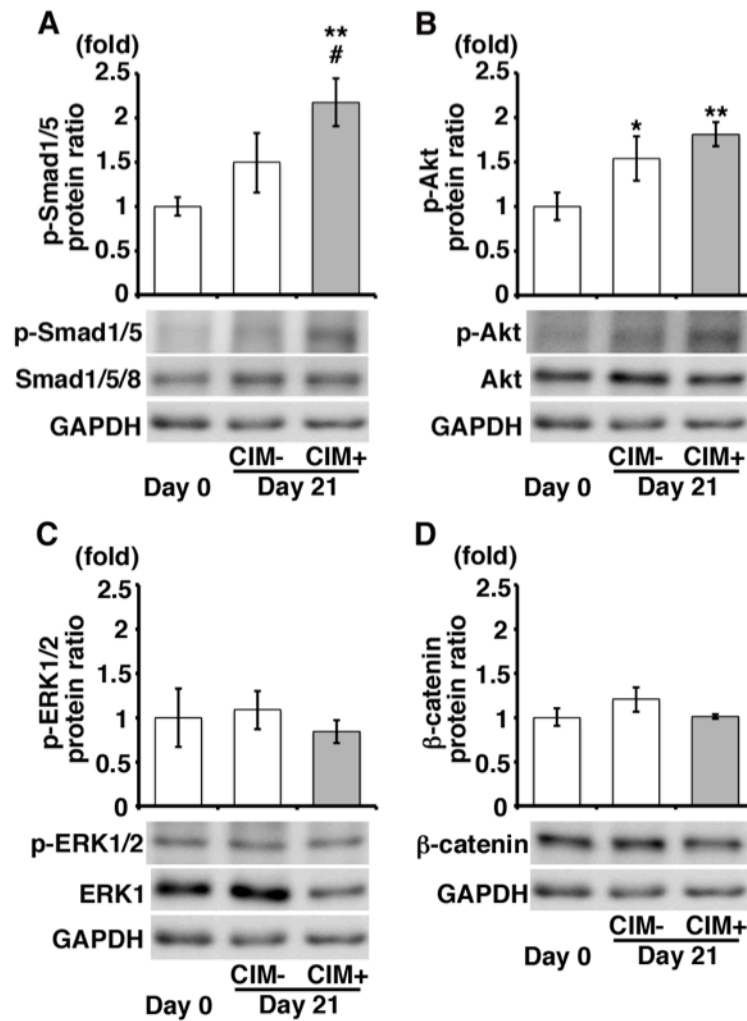


Fig. 7 mDE6 細胞の石灰化誘導培養による Runx2 上流シグナル因子のタンパク発現変化

- A : p-Smad1/5 のタンパク発現は、Day 0 と Day 21 CIM- に比べて Day 21 CIM+ で有意な増加を認めた。
- B : p-Akt のタンパク発現は、Day 0 に比べて Day 21 CIM- および CIM+ で有意な増加を認めた。
- C : p-ERK1/2 のタンパク発現は、Day 0 と Day 21 CIM- に比べて Day 21 CIM+ で減少傾向を認めた。
- D : β-catenin のタンパク発現については著明な変化を認めなかった。

(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ は Day 0、# $p < 0.05$ は Day 21 CIM- に対する有意差を示す)

4-3 : Runx2 上流シグナル因子の阻害実験

mDE6 細胞の石灰化誘導による Runx2 の発現増加に Smad1/5/8 と Akt のリン酸化が関与していると考えられた。そこで、p-Smad1/5/8 のリン酸化阻害剤である LDN193189 と p-Akt のリン酸化阻害剤である Triciribine を添加した状態で、Runx2 のタンパク発現を検索した。また、阻害剤添加条件下で石灰化誘導培養を行い、歯原性関連因子の mRNA 発現や石灰化様構造物の形成に与える影響について検討した。

4-3-1 : 阻害効果の確認と Runx2 の発現変化

LDN193189 添加群では、p-Smad1/5 のタンパク発現が阻害剤未添加群に比べて添加濃度 50 nM では約 0.6 倍、500 nM では約 0.5 倍になり、有意に減少していた (Fig. 8A)。Triciribine 添加群では、p-Akt のタンパク発現が阻害剤未添加群に比べて添加濃度が 250 nM では約 0.7 倍、2500 nM では約 0.5 倍になり、有意に減少していた (Fig. 8B)。

Runx2 のタンパク発現は、LDN193189 添加群の添加濃度 50 nM においては約 0.7 倍、500 nM においては約 0.6 倍になり、有意に減少していた (Fig. 8C)。

同様に、Triciribine 添加群の添加濃度 250 nM において有意差を認めなかったが、約 0.8 倍に発現が減少し、2500 nM において約 0.6 倍になり有意に減少していた (Fig. 8D)。

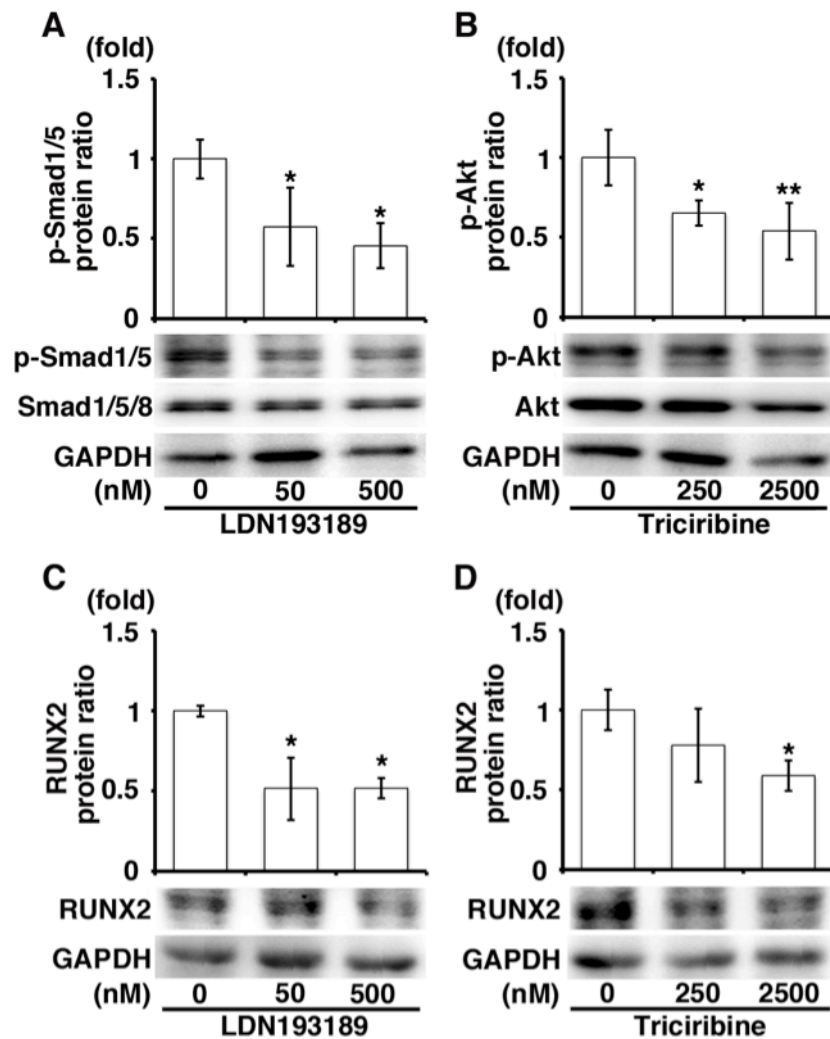


Fig. 8 阻害剤添加による p-Smad1/5、p-Akt および Runx2 のタンパク発現変化

A : LDN193189 添加により p-Smad1/5 の有意な発現減少を認めた。Smad1/5/8 の発現に著明な変化を認めなかった。

B : Triciribine 添加により p-Akt の有意な発現減少を認めた。Akt の発現に著明な変化を認めなかった。

C : LDN193189 添加により Runx2 の発現は有意な減少を認めた。

D : Triciribine 添加により Runx2 の発現は添加濃度依存的な減少を認め、添加濃度 2500 nM において有意な発現の減少を認めた。

(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ は阻害剤未添加群に対する有意差を示す)

4-3-2 : 歯原性関連因子の mRNA 発現と石灰化様構造物の形成変化

阻害剤添加48時間後の試料を用いて歯原性関連因子の mRNA 発現を検索した。また、阻害剤添加条件下で石灰化誘導培養を行い石灰化様構造物の形成を ALZ 染色により検索した。

LDN193189 添加濃度 50、500 nM とともに、Amelx の mRNA 発現は約 0.3 倍になり、発現が有意に減少していた (Fig. 9A)。Ambn の mRNA 発現は、LDN193189 添加群では認められなかった (Fig. 9B)。Enam mRNA の発現では有意差を認めなかったが、LDN193189 添加濃度 50 nM で約 0.3 倍、500 nM で約 0.4 倍になり、減少していた (Fig. 9C)。

ALZ 染色陽性像は、LDN193189 添加濃度依存的に減弱していた (Fig. 9D)。

Triciribine 添加条件下の Amelx の mRNA 発現は、Triciribine 添加濃度 250 nM では約 0.6 倍になり有意に減少しており、2500 nM では有意差を認めなかったが約 0.6 倍に減少していた (Fig. 9E)。Triciribine 添加群においても Ambn の mRNA 発現は認められなかった (Fig. 9F)。Enam mRNA の発現では有意差を認めなかったが、Triciribine 添加濃度 250 nM で約 0.5 倍、500 nM で約 0.2 倍に減少していた (Fig. 9G)。

ALZ 染色陽性像は Triciribine 添加濃度依存的に減弱していた (Fig. 9H)。

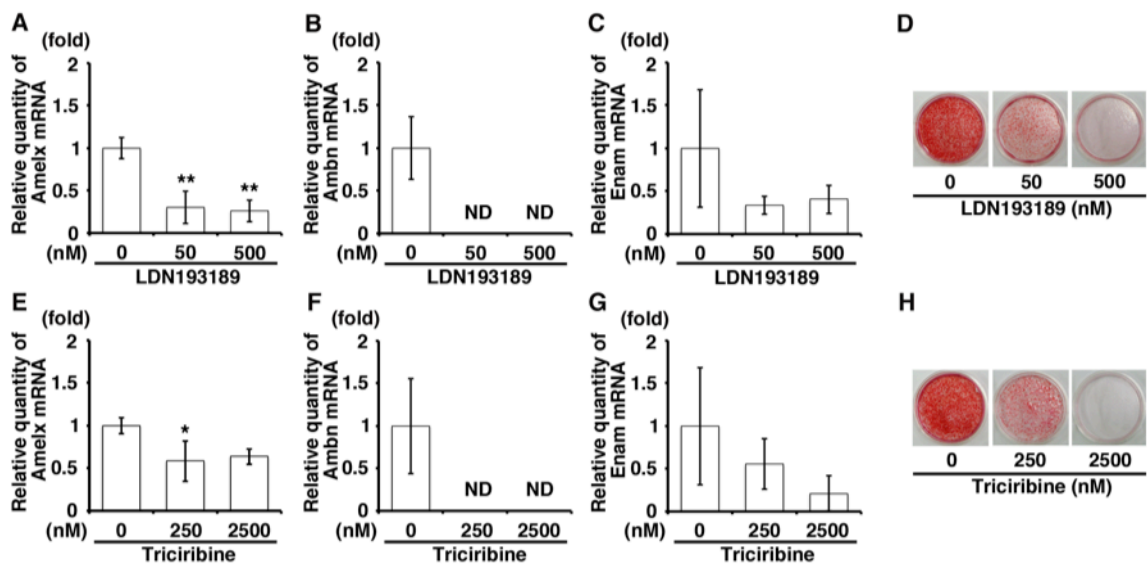


Fig. 9 阻害剤添加条件下石灰化誘導培養による歯原性関連因子 mRNA の発現変化と ALZ 染色による石灰化様構造物の形成変化

A-C : LDN193189 添加により Amelx の mRNA 発現の有意な減少を認めた (A)。阻害剤添加群で Ambn mRNA 発現は検出できなかった (B)。Enam の mRNA 発現では減少傾向を認めた (C)。

D : LDN193189 添加条件下石灰化誘導培養により ALZ 染色陽性面積は阻害剤添加濃度依存的に減少を認めた。

E-G : Triciribine 添加により Amelx の mRNA 発現の有意な減少を認めた (E)。阻害剤添加群で Ambn の mRNA 発現は検出できなかった (F)。Enam の mRNA 発現では減少傾向を認めた (G)。

H : Triciribine 添加条件下石灰化誘導培養により ALZ 染色陽性面積は阻害剤添加濃度依存的に減少を認めた。

ND: not detectable

(*p<0.05、**p<0.01 は阻害剤未添加群に対する有意差を示す)

4-4 : siRNA 法による Tb4 機能抑制実験

mDE6 細胞において Tb4 が Runx2 とその上流シグナル因子の発現に影響を及ぼすかを検討するため、siRNA 法による Tb4 機能抑制下に Runx2 とその上流シグナル因子の発現を検索した。さらに、Tb4 機能抑制下において石灰化誘導培養を行い石灰化様構造物の形成に対する影響についても検討した。

4-4-1 : Tb4 機能抑制効果の確認と Runx2 の発現変化

Tb4 の mRNA 発現は、Ut と Cont 群に比べて Tb4 siRNA 群の siRNA-1 (si-1) 群において約 0.1 倍、siRNA-2 (si-2) 群において約 0.2 倍、siRNA-3 (si-3) 群において約 0.3 倍になり有意に減少していた (Fig. 10A)。

Tb4 のタンパク発現は、Ut と Cont 群に比べて si-1 群において約 0.5 倍になり有意に減少していた。si-2、-3 群において有意差を認めなかったが、それぞれ約 0.6、0.7 倍になり、発現が減少していた (Fig. 10B)。

Runx2 の mRNA 発現は、Ut と Cont 群に比べて si-1 群において約 0.5 倍になり、有意に減少していた。si-2 群において有意差を認めなかったが、約 0.7 倍に発現が減少していた。si-3 群では発現量に変化はなかった (Fig. 10C)。

Runx2 のタンパク発現は、si-1、-2 群において約 0.5 倍になり、有意に減少していた。si-3 群において有意差を認めなかったが、約 0.7 倍に発現が減少していた (Fig. 10D)。

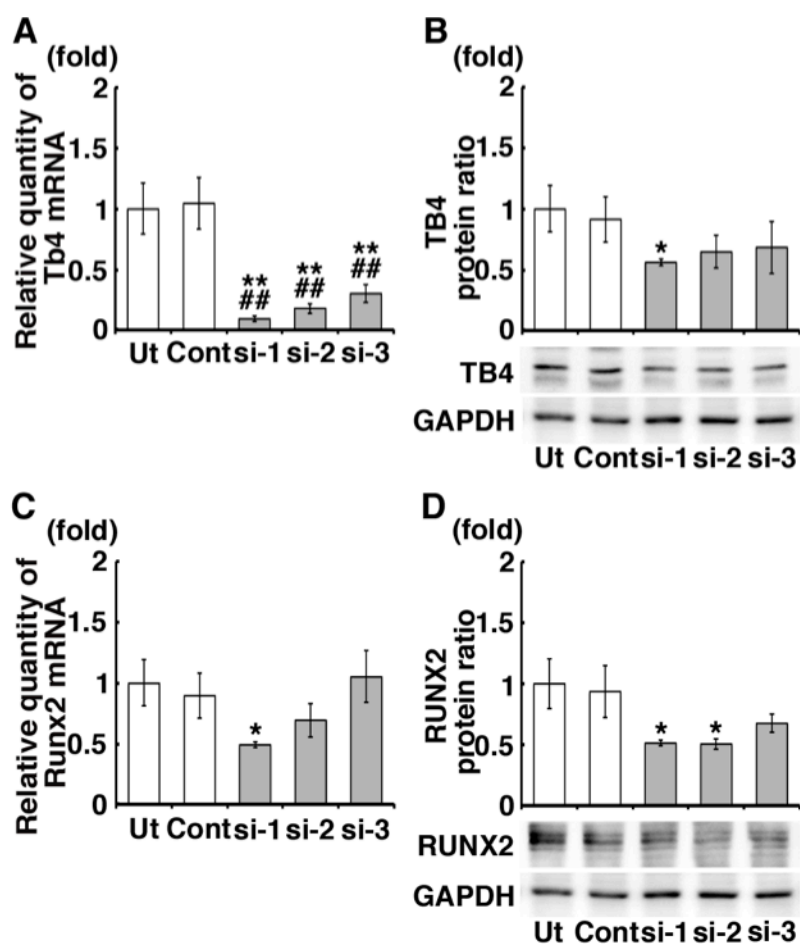


Fig. 10 Tb4 機能抑制効果の確認と Runx2 の mRNA およびタンパク発現変化

- A : Tb4 の mRNA 発現ではすべての siRNA 群で大きな発現の減少を認めた。
- B : Tb4 のタンパク発現では si-1 群で有意な発現の減少を認め、si-2、-3 群で減少傾向を認めた。
- C : Runx2 の mRNA 発現では si-1 群で有意な発現の減少を認め、si-2 群で減少傾向を認めた。si-3 群においては変化を認めなかった。
- D : Runx2 のタンパク発現では si-1、-2 群で発現の有意な減少を認め、si-3 群で減少傾向を認めた。

(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ は Ut 群、## $p < 0.01$ は Cont 群に対する有意差を示す)

4-4-2 : Tb4 機能抑制下石灰化誘導培養による石灰化様構造物の形成変化

Tb4 機能抑制下において石灰化誘導培養を行い、ALZ 染色により石灰化様構造物の形成を確認した (Fig. 11A)。ALZ 染色陽性面積の割合は、Ut と Cont 群に比べて si-1、-2 群では約 0.9 倍、si-3 群では 0.8 倍になり、有意に減少していた (Fig. 11B)。

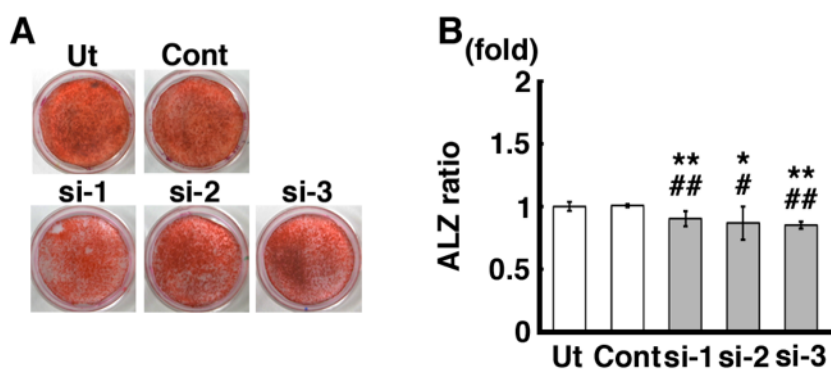


Fig. 11 Tb4 機能抑制下石灰化誘導培養による ALZ 陽性面積割合の比較

A : Ut 群、Cont 群 (上段) および siRNA 群 (下段) における ALZ 染色像を示す。

B : ALZ 陽性面積の割合は、Ut と Cont 群に比べて siRNA 群ではその割合が軽度ではあるが、有意に減少していた。

(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ は Ut 群、# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ は Cont 群に対する有意差を示す)

4-4-3 : Tb4 機能抑制下における Runx2 上流シグナル因子のタンパク発現

siRNA 処理 48 時間後の mDE6 細胞の Runx2 上流シグナル因子のタンパク発現を検索した。

p-Smad1/5 のタンパク発現は、Ut と Cont 群に比べて si-1 群においては約 0.7 倍、si-2 群においては約 0.6 倍になり、有意に減少していた。si-3 群においては有意差を認めなかったが、約 0.7 倍に減少していた。Smad1/5/8 のタンパク発現は有意差を認めなかった (Fig. 12A)。

p-Akt のタンパク発現は、Ut と Cont 群に比べて si-1 群においては約 0.6 倍、si-3 群においては約 0.7 倍になり、有意に減少していた。si-2 群においては有意差を認めなかったが、約 0.8 倍に減少していた。Akt のタンパク発現に有意差は認めなかった (Fig. 12B)。

p-ERK1/2 のタンパク発現は、Ut と Cont 群に比べて有意差を認めなかったが、si-1、-2 群においては約 0.8 倍に減少していた。si-3 群において変化は認めなかった。ERK1 のタンパク発現は、Cont 群に比べて si-1 群において約 0.7 倍になり、有意に減少していた (Fig. 12C)。

β -catenin のタンパク発現では Ut と Cont 群に比べて有意差を認めなかったが、si-1、-2 群においては約 0.8 倍に減少してした。si-3 群において有意差を認めなかった (Fig. 12D)。

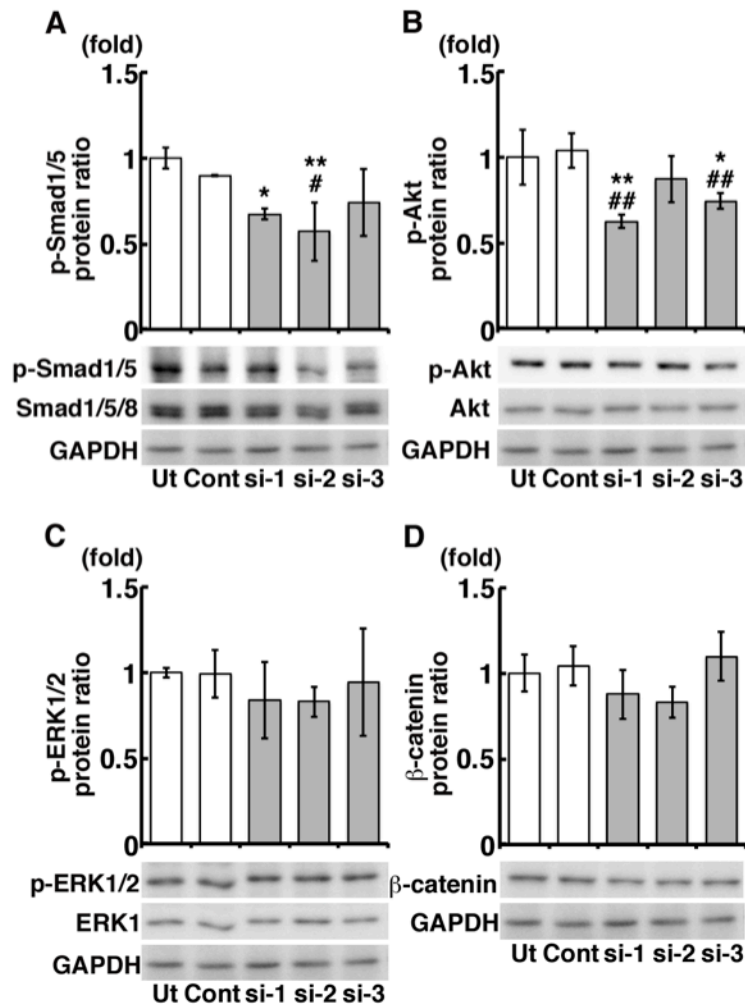


Fig. 12 Tb4 機能抑制下における Runx2 上流シグナル因子のタンパク発現比較

- A : p-Smad1/5 の発現は Ut と Cont 群に比べて si-1、-2 群で有意な発現の減少を認めた。si-3 群で減少傾向を認めた。Smad1/5/8 の発現に著明な変化を認めなかった。
- B : p-Akt の発現は、Ut 群、Cont 群に比べて si-1、-3 群で有意な発現の減少を認めた。si-2 群において減少傾向を認めた。Akt の発現に著明な変化を認めなかった。
- C, D : p-ERK1/2 と β-catenin の発現は、Ut と Cont 群に比べて si-1、-2 群において減少傾向を認めたが、有意差を認めなかった。

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ は Ut 群、# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ は Cont 群に対する有意差を示す)

4-5 : マウス初代口腔扁平上皮細胞由来 Tb4 過剰発現細胞の解析

ヒト皮膚由来角化細胞株での Tb4 の過剰発現により、Runx2 や歯原性関連因子を発現する歯原性上皮様細胞に形質転換する可能性について報告した (Kiyoshima et al., 2014)。将来的にヒトの口腔粘膜上皮から単離・培養した上皮細胞に対し、Tb4 を遺伝子導入することで、自己細胞由来歯原性上皮細胞の作製を目指している。そこで、マウスの口腔粘膜上皮より扁平上皮細胞を単離・培養し、Tb4 発現ベクターを遺伝子導入することで、初代培養細胞においても歯原性上皮細胞様に形質転換する可能性があるかを検討した。

4-5-1 : マウス初代口腔扁平上皮細胞の単離と培養

マウス初代口腔扁平上皮細胞は、生後 2-3 週齢の BALB/c 雄マウスの上下顎臼歯肉上皮組織をシート状に分離し (Fig. 13A)、培養された (Fig. 13B)。

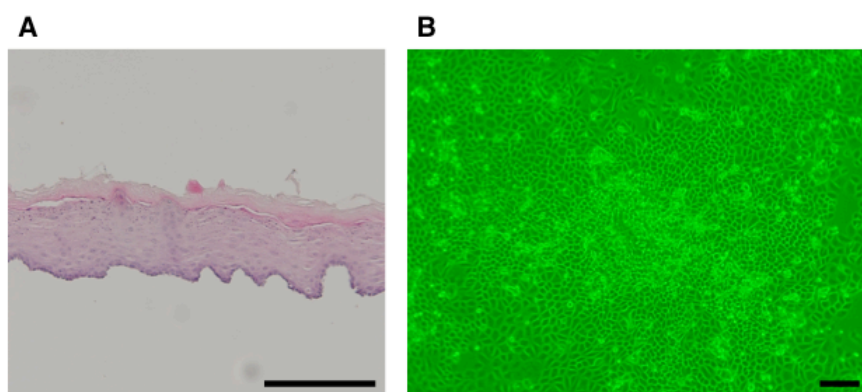


Fig. 13 上皮組織の分離とマウス初代口腔扁平上皮細胞の培養

A : 結合組織から分離した上皮組織の HE 染色像を示す。上が粘膜表層、下が粘膜基底層。

B : 培養中のマウス初代口腔扁平上皮細胞の位相差顕微鏡像を示す。

Scale bars : 200 μ m

4-5-2 : Tb4 過剰発現細胞の作製

マウス初代口腔扁平上皮細胞に対し Tb4 発現ベクターを遺伝子導入し、Tb4 過剰発現細胞に選出するため Tb4 の mRNA 発現を Real-time PCR 法により検索した。Ut と Mock に比較し、2 倍以上の Tb4 mRNA 発現を示すクローンを Tb4 過剰発現クローン (High-Tb4) とした (Fig. 14A)。

位相差顕微鏡により、Ut、Mock および High-Tb4 群の細胞形態を比較したところ、細胞形態に著明な変化を認めなかった (Fig. 14B)。

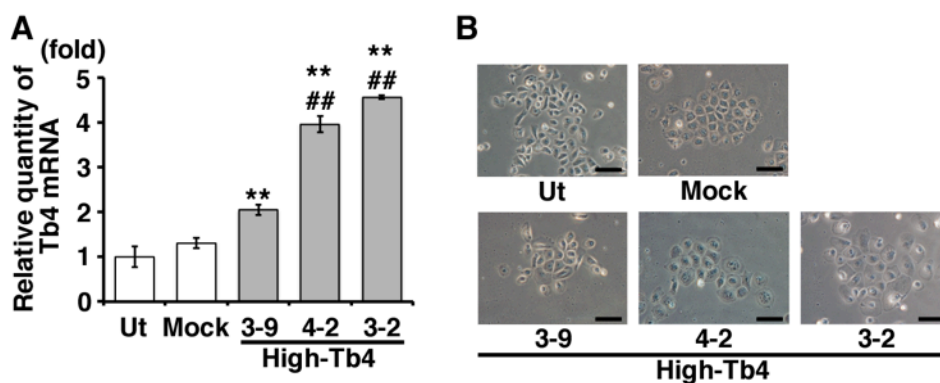


Fig. 14 Tb4 の mRNA 発現と細胞形態比較

A : High-Tb4 群における Tb4 の mRNA 発現を示す。Tb4 の mRNA 発現が、Ut と Mock に比べて 2 倍以上に発現が増加しているクローンを High-Tb4 とした。

B : 位相差顕微鏡像において Ut、Mock および High-Tb4 群の細胞形態に大きな変化は認めなかった。

Scale bars : 200 μm

(** $p < 0.01$ は Ut と Mock、## $p < 0.01$ は Tb4-High #3-9 に対する有意差を示す)

4-5-3 : Tb4 過剰発現細胞における歯原性関連因子の mRNA 発現

High-Tb4 群における歯原性関連因子の mRNA 発現を Real-time PCR 法により検索した。Ut と Mock においては歯原性関連因子の mRNA の発現を認めなかったため、High-Tb4 #3-9 における発現量を基準として、その他のクローンと比較した。ポジティブコントロールとして、胎生 18 日齢マウス下顎臼歯歯胚 (Tooth germ 〈embryonic 18 day〉 ; Tg 〈E18〉) を使用した。

Amelx の mRNA 発現では、High-Tb4 #3-9 に比べて High-Tb4 #4-2 で約 2 倍発現していた。Ut, Mock および High Tb4 #3-2 では発現を認めなかった (Fig. 15 A)。

Ambn の mRNA 発現は、High-Tb4 #3-9 に比べて High-Tb4 #4-2 で約 0.4 倍、High-Tb4 #3-2 で約 1.2 倍発現していた。Ut と Mock では、発現を認めなかった (Fig. 15B)。Enam の mRNA 発現は、High-Tb4 #3-9 に比べて High-Tb4 #4-2 で約 3 倍、High Tb4 #3-2 で約 2 倍発現していた。Ut と Mock では発現を認めなかった (Fig.15C)。

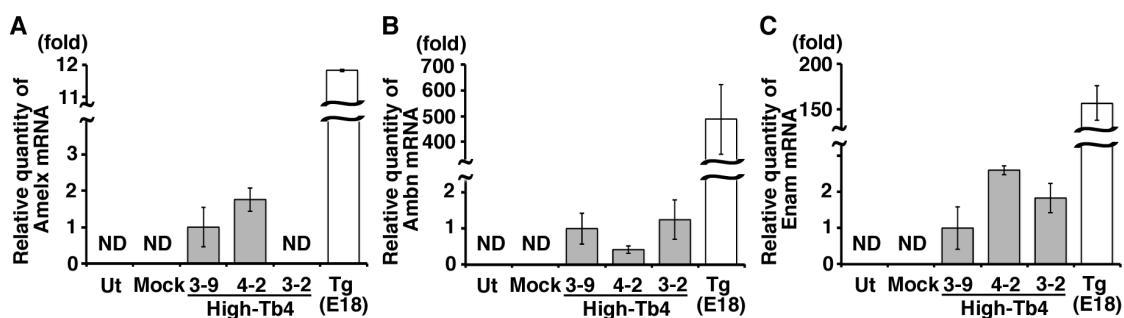


Fig. 15 High-Tb4 群における歯原性関連因子の mRNA 発現比較

- A : High-Tb4 #3-9 と #4-2 において、Amelx の mRNA 発現を認めた。Ut, Mock および High Tb4 #3-2 では発現を認めなかった。
- B : High-Tb4 #3-9、#4-2 および #3-2 において、Ambn の mRNA の発現を認めた。Ut と Mock においては発現を認めなかった。
- C : High-Tb4 #3-9、#4-2 および #3-2 において、Enam の mRNA 発現を認めた。Ut と Mock においては発現を認めなかった。ND: not detectable

4-5-4 : Tb4 過剰発現細胞における歯原性関連因子タンパクの免疫染色

High-Tb4 群における歯原性関連因子のタンパク発現を免疫細胞化学染色によって検索した。

AMELX は、High-Tb4 #3-9、#4-2 において細胞質に顆粒状の染色陽性像を認めた (Fig. 16g, j)。AMBN は、High-Tb4 群すべてにおいて細胞質に顆粒状の染色陽性像を認めた (Fig. 16h, k, n)。ENAM は、いずれの High-Tb4 群においても発現を認めなかった (Fig. 16i, l, o)。Ut と Mock においては、いずれの歯原性関連因子タンパクも陽性像を認めなかった (Fig. 16a-f)。

AMELX と AMBN の染色陽性像は、それぞれの mRNA 発現と傾向が一致していたが、ENAM については一致していなかった。

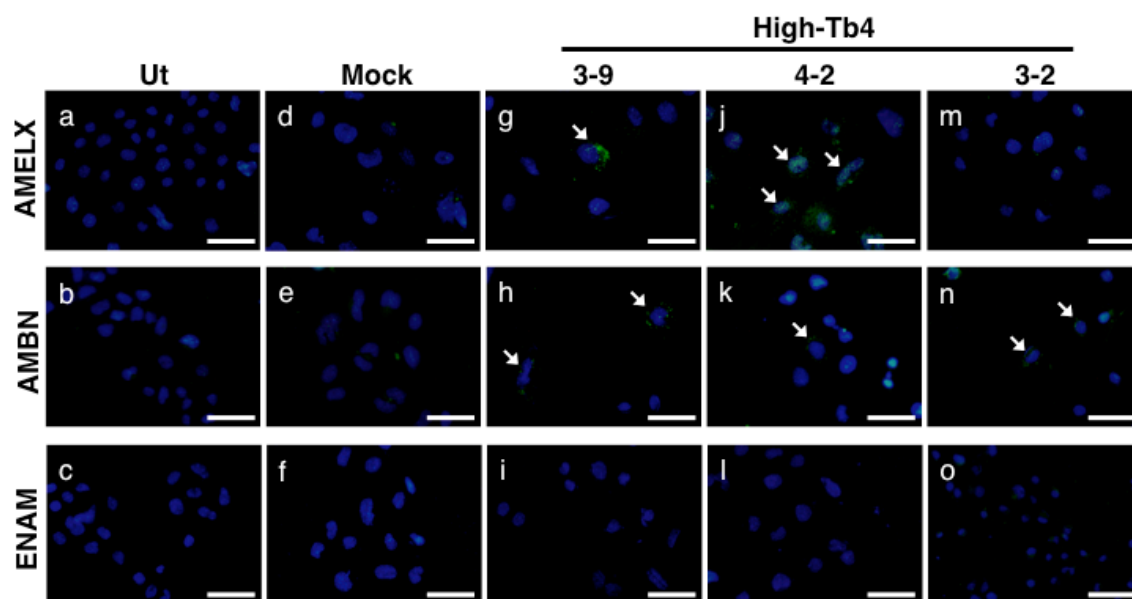


Fig. 16 High-Tb4 群における歯原性関連因子タンパクの免疫細胞化学染色像

AMELX は High-Tb4 #3-9、#4-2 において陽性像を認め (g, j; 白矢印)、#3-2 では陽性像を認めなかった (m)。AMBN はすべての High-Tb4 群において陽性像を認めた (h, k, n; 白矢印)。ENAM はいずれの High-Tb4 群においても陽性像を認めなかった (i, l, o)。

Scale bars : 50 μ m

5. 考 察

5-1 : 本研究の意義

当研究室では、胎生 10.5 日齢に比べて胎生 12.0 日齢のマウス下顎に差別的に発現する Tb4 を見出し (Yamaza et al., 2001)、Tb4 と歯の発生との関連について研究を行ってきた (Akhter et al., 2005; Ookuma et al., 2013; Kiyoshima et al., 2014)。

Tb4 は歯の発生初期より、歯胚が形成される部位の口腔上皮や内エナメル上皮に強く発現しており (Akher et al., 2005)、Tb4 機能抑制下での歯胚の器官培養により、Tb4 が Runx2 の発現を介して歯の形態形成に関与していることを示した (Ookuma et al., 2013)。さらに、Tb4 をヒト皮膚由来角化細胞へ遺伝子導入することで、Runx2 や歯原性関連因子の発現が誘導される可能性について報告してきた (Kiyoshima et al., 2014)。これらの研究より、Tb4 は Runx2 を介して歯原性上皮細胞の分化に関与している可能性が示唆された。しかし、歯原性上皮細胞において Tb4 が Runx2 を調節する分子メカニズムについては明らかになっていない。そこで、本研究ではマウス歯原性上皮細胞株を用いて石灰化誘導培養、阻害実験および Tb4 機能抑制実験を行い、Tb4 が Smad や PI3K-Akt 経路を介して Runx2 や歯原性関連因子の発現、石灰化に影響を及ぼしている可能性を示した。また、初代口腔扁平上皮細胞への Tb4 遺伝子の導入により、歯原性上皮様細胞に形質転換する可能性を示した。本研究結果は、初代口腔扁平上皮細胞において Tb4 を遺伝子導入し、より効率的に歯原性上皮細胞を作製するうえで、有意義な知見であると考えられる。

5-2 : mDE6 細胞の実験材料としての有用性の確認

mDE6 細胞は、マウス歯胚の歯胚上皮より樹立した歯原性上皮細胞株である。そこで、mDE6 細胞が石灰化誘導培養により石灰化を生じ、Runx2 の発現や歯原性関連因子の発現が増加しているかを検索し、歯原性上皮細胞としての性質を有しているかを確認した。

mDE6 細胞は石灰化誘導培養により ALP 活性、歯原性関連因子の増加および石灰化様構造物の形成を認めた。免疫細胞化学染色によりこの石灰化様構造物に歯原性関連因子タンパクが含まれることを確認した。これらの結果より、mDE6 細胞は歯原性上皮細胞としての性質を有しており、実験材料として有用であると考えられる。このため、続けて本研究に用いた。

5-3 : 石灰化誘導培養による Runx2、歯原性関連因子および石灰化への影響

Runx2 は骨分化に関わる主要な転写因子としてよく知られている (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Mundlos et al., 1997) が、歯の発生においても重要な役割を果たしていることが報告されている (Åberg et al., 2004; Camilleri et al., 2006; Kobayashi et al., 2006; Lee et al., 2013; Ookuma et al., 2013)。Runx2 は、歯の発生において歯胚間葉のみならず成熟期のエナメル芽細胞にも発現を認め (D'Souza et al., 1999)、Fgf3、Shh、Amelx、Ambn、Dmp および Dspp などの様々な歯原性関連因子の発現を調節していることが報告されている (Dhamija et al., 2001; Åberg et al., 2004; Kobayashi et al., 2006)。

そこで、mDE6 細胞の石灰化誘導培養における Runx2 の発現を検索したところ、mRNA とタンパクともに有意に増加していた。さらに、石灰化非誘導群に

比べ、誘導群では *Amelx*、*Ambn* および *Enam* の mRNA 発現が増加していた。

これらの結果より、mDE6 細胞は石灰化誘導培養によって *Runx2* や歯原性関連因子の発現が誘導されると考えられる。

5-4 : 石灰化誘導培養と阻害条件下における *Runx2* 上流シグナル因子検索

mDE6 細胞において *Runx2* 発現を調節しているシグナル経路検索を行った。骨芽細胞において *Smad*、*PI3K-Akt*、*MAPK*、*FGF* および *Wnt/β-catenin* 経路などにより *Runx2* 発現が調節されていることが報告されている (Martin et al., 2011)。また、ヒト歯髄細胞株においても、*Smad*、*MAPK* および *Wnt/β-catenin* 経路により *Runx2* の発現が調節されていることが報告されている (Lee et al., 2013; Han et al., 2014)。そこで、21 日間石灰化誘導培養した mDE6 細胞における p-*Smad1/5*、*Smad1/5/8*、p-*Akt*、*Akt*、p-*ERK1/2*、*ERK1* および *β-catenin* のタンパク発現を検索した。

mDE6 細胞の石灰化誘導培養により、非誘導群に比べて誘導群において p-*Smad1/5* のタンパク発現が有意に増加していた。p-*Akt* のタンパク発現は、誘導開始時に比べて誘導群と非誘導群ともに発現が増加しており、誘導群と非誘導群の間に有意差を認めなかった。p-*ERK1/2* と *β-catenin* のタンパク発現では、誘導開始時、非誘導および誘導 21 日目で有意差を認めなかった。これらの結果より、mDE6 細胞の石灰化誘導時に *Smad* 経路の活性化が関与している可能性が考えられる。

次に、p-*Smad1/5* と p-*Akt* のリン酸化阻害剤である LDN193189、Triciribine による阻害実験において阻害剤添加群で p-*Smad1/5* や p-*Akt* のタンパク発現は減少

し、Runx2 のタンパク発現と歯原性関連因子の mRNA 発現も有意に減少していた。特に、歯原性関連因子のなかで、Ambn の mRNA 発現は阻害剤添加群において Real-timePCR 法により検出できない程度まで抑制されていた。阻害剤添加条件下での石灰化誘導培養において、Smad または Akt のいずれかの経路の活性化を阻害すると、濃度依存的に石灰化の減弱を認めた。過去の研究において、LDN193189 による Smad1/5/8 タンパクのリン酸化阻害によって骨髄間質細胞で Runx2 発現が有意に減少することが報告されている (Hu et al., 2014)。また、ヒト間葉系幹細胞において象牙質ホスホホリンの添加により Smad 経路を介し Runx2 の発現に影響を与えることが報告されている (Jadlowiec et al., 2005)。上述した Runx2 により歯原性関連因子の発現が調節されている結果と併せて考えると、mDE6 細胞における Runx2 や歯原性関連因子の発現調節には Smad 経路が関与している可能性が考えられる。

一方で、これまで歯の発生と PI3K-Akt 経路との関連については、歯原性腫瘍細胞における細胞の分化や増殖への関与が報告されている程度である (Kumamoto et al., 2007)。本研究結果により、PI3K-Akt 経路が歯原性上皮細胞において Runx2 や歯原性関連因子の発現、そして石灰化に関与していることが示唆された。

また、阻害剤添加により Ambn の mRNA 発現が阻害剤添加群において検出できなかった点に関して、過去の研究において Ambn のプロモーター領域に Runx2 結合領域が存在することが報告されている (Dhamija et al., 2001) ことから、阻害剤添加による Runx2 の発現減少が Ambn の転写活性の抑制に大きく影響した可能性が考えられる。

p-ERK1/2 や β -catenin のタンパク発現については著明な変化を認めなかったため、mDE6 細胞における Runx2 の発現に関与している可能性は低いと考えられた。しかし、MAPK や Wnt/ β -catenin 経路も Runx2 の発現を調節していることが報告されている (Lee et al., 2013; Han et al., 2014) ため、これらの因子の細胞内での局在変化などを今後検討していく必要があると考えている。

5-5 : Tb4 による Runx2 の発現調節と石灰化への影響

Tb4 はアクチン隔離ペプチドとしてよく知られており、G アクチンとの結合により、アクチンフィラメントの重合調節をしている。Tb4 はドメイン構造として G アクチン結合領域を始め、抗炎症、血管新生、抗アポトーシスなどに働く領域を有している (Fig. 1)。しかし、転写因子に認められる DNA 結合領域、トランス活性化領域、シグナル活性化領域は有していない。それにも関わらず、Tb4 は細胞質のみならず、核内にも発現を認め (Huff et al., 2004)、MMP-2、laminin-5、TGF β などの生物学的活性にとって重要な因子の発現を調節していることが報告されている (Philp et al., 2004; Sosne et al., 2004; Cha et al., 2010)。また、Smart らは、Tb4 が心筋細胞修復において転写因子として知られる Wt1 遺伝子の発現を誘導することを報告している (Smart et al., 2011)。これらの結果より、Tb4 は、転写因子に対するメディエーター活性を有することが考えられる。そこで、siRNA 法を用いた Tb4 機能抑制実験により、mDE6 細胞において Tb4 が転写因子である Runx2 の発現や石灰化を調節しているかを検討した。

siRNA 法により、Tb4 の発現は mRNA とタンパクレベルにおいて有意に減少していた。Runx2 の発現と石灰化においても有意な減少を認めた。しかし、siRNA

プローブの種類によって Tb4 の機能抑制効果や Runx2 の発現および石灰化の減少度は異なっていた。我々の過去の研究においても、Tb4 に対する 3 種類の siRNA を設計し、Tb4 過剰発現細胞に対して Tb4 機能抑制下に石灰化誘導培養を行ったところ、2 種類の siRNA 群では石灰化がほぼ消失していたが、もう 1 種類の siRNA 群では軽度の石灰化の減弱を認める程度であった (Kiyoshima et al., 2014)。siRNA 法には、1 塩基でも配列が異なれば RNA 干渉作用が異なることや非特異的な遺伝子の発現抑制を起こすこと (オフターゲット効果) などが報告されており (Jackson et al., 2004)、これらが siRNA プローブの種類による Tb4 機能抑制効果の違いの原因かもしれない。

また過去の研究に比べ、今回 Tb4 機能抑制による Runx2 の発現や石灰化の減少の程度が予想に比べ軽度であった。これは、以前報告した Tb4 過剰発現細胞は強制的に Tb4 を発現させることで、非歯原性角化細胞を歯原性上皮様細胞に形質転換させたのに対し、今回用いた mDE6 細胞はマウス歯胚上皮より樹立した歯原性上皮細胞株であるという細胞種の違いが影響しているかもしれない。

5-6 : Tb4 による Runx2 上流シグナル因子の発現調節

過去の研究において、Tb4 は Akt のリン酸化 (Bock-Marquette et al., 2004) や BMP-2/-4 による Smad1/5/8 のリン酸化に影響を与えることが報告されている (Lee et al., 2013)。そこで、Tb4 による Runx2 の発現調節に関わっているシグナル経路の一端を明らかにするため、Smad、PI3K-Akt、MAPK および Wnt/ β -catenin 経路のシグナル因子について検索を行った。

Tb4 の機能抑制により、p-Smad1/5 と p-Akt のタンパク発現が有意に減少して

いた。しかし、その発現の減少度は、Runx2 の発現減少度と完全には一致していなかった。これは、mDE6 細胞においては Runx2 が Smad や PI3K-Akt 経路を含む複数の経路によってその発現が調節されている可能性を示唆している。一方、p-ERK1/2 や β -catenin のタンパク発現は減少傾向を示したが、有意差を認めなかった。これらの結果より、Tb4 は Smad や Akt 経路に影響を与えることで、Runx2 の発現調節の一部を担っている可能性が考えられる。

5-7 : Tb4 導入による初代扁平上皮細胞から歯原性上皮細胞への形質転換

当研究室ではヒト皮膚由来角化細胞株への Tb4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞株への形質転換の可能性について報告した (Kiyoshima et al., 2014)。将来、ヒトの口腔粘膜上皮細胞を単離・培養し Tb4 を遺伝子導入することで歯原性上皮細胞を作製することを目指している。そこで、本研究ではマウス歯肉と口蓋より単離・培養した初代扁平上皮細胞を用いて、Tb4 遺伝子の発現を増加させることで、初代口腔扁平上皮細胞が歯原性上皮細胞へ形質転換する可能性について検索した。

マウス初代口腔扁平上皮細胞への Tb4 遺伝子導入により歯原性関連因子である Amelx、Ambn および Enam の mRNA 発現を認め、免疫細胞化学染色においても AMELX や AMBN の染色陽性像を認めた。歯原性関連因子の mRNA 発現検索でポジティブコントロールとして用いた胎生 18 日齢の歯胚と比べて、今回解析した Tb4 過剰発現細胞における歯原性関連因子の発現は非常に低かった。胎生 18 日齢の歯胚は鐘状期後期に相当し、エナメル芽細胞の分化期に相当することを考慮すると、今回作製した Tb4 過剰発現細胞は、歯胚の発生における分

化期より前段階の歯原性上皮細胞に形質転換した可能性が考えられる。

しかし、歯の再生を行うためには歯胚と同程度の歯原性関連因子の発現が必要であるため、今回検索したいシグナル経路を参考にし、歯原性関連因子をより高発現するような細胞の作製に取り組んでいく必要があると考えている。

本研究によって株化細胞のみならず初代口腔培養細胞においても **Tb4** の遺伝子導入により、歯原性上皮細胞へ形質転換する可能性が示された。しかし、初代口腔培養細胞への **Tb4** 遺伝子導入においても、**mDE6** 細胞と同様の経路によって歯原性関連因子の発現が調節されているかは明らかになっていない。今後、歯原性関連因子の発現が歯胚と同程度まで発現するような歯原性上皮細胞を作製する手法を確立するため、初代口腔扁平上皮細胞由来の **Tb4** 過剰発現細胞においても **Tb4-Runx2** 間に関与するシグナル経路について検索していく必要があると考えている。

6. 総括

本研究では、歯原性上皮細胞株である mDE6 細胞における Tb4-Runx2 間の発現調節メカニズムの検索とマウス初代口腔扁平上皮細胞由来 Tb4 過剰発現細胞の解析を行い、以下のような結果を得た。

1. mDE6 細胞は、石灰化誘導培養により ALP 活性や歯原性関連因子の mRNA 発現を増加させ、歯原性関連因子タンパクを含む石灰化様構造物を形成する細胞であることを確認した。
2. 石灰化誘導培養により Runx2 と歯原性関連因子の発現は増加し、その発現調節には Smad や Akt 経路が関与している可能性が示唆された。
3. Tb4 機能抑制実験によって、Tb4 は Runx2 の発現調節の一部に関与しており、その発現調節には Smad や Akt 経路の関与が示唆された。
4. マウス初代口腔扁平上皮細胞における Tb4 遺伝子導入により、歯原性関連因子の mRNA 発現の増加に加えて免疫細胞化学染色において歯原性関連因子のタンパク発現を認めた。これより、初代口腔培養細胞においても Tb4 遺伝子導入により歯原性上皮様細胞へ形質転換する可能性が示唆された。

以上より、mDE6 細胞における Tb4 による Runx2 の発現調節に関わるシグナル経路として Smad や Akt 経路が関与していることが示された (Fig. 17)。

今後、初代口腔培養細胞から歯原性上皮細胞を作製するうえで本知見は有用であると考えられる。

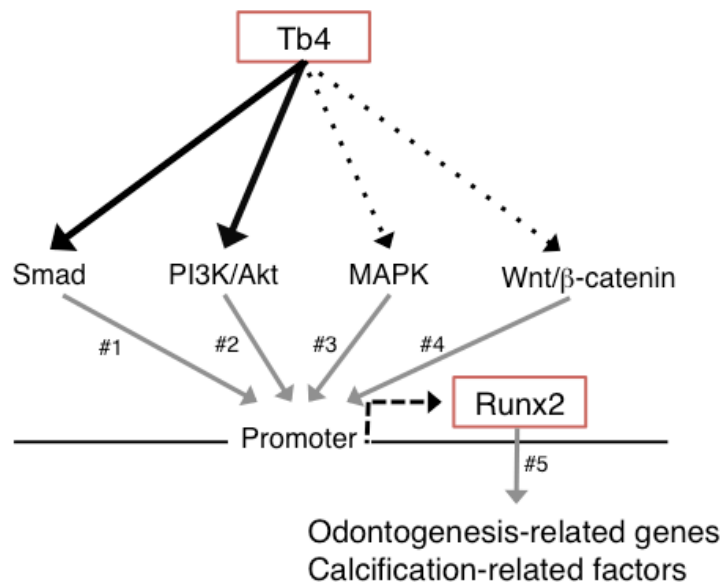


Fig. 17 歯原性上皮細胞株における Tb4-Runx2 間に関与するシグナル経路

黒実線矢印 : 本実験で Runx2 の発現を調節することが示された経路 (Smad、PI3K-Akt 経路)

黒点線矢印 : 本実験で変化を認めなかった経路 (MAPK、Wnt/β-catenin 経路)

灰色実線矢印 : 他の研究においてすでに報告されている経路

シエーマ内の番号で示した経路に関する参考文献を下記に記す。

#1: Jadowiec et al., 2005; Martin et al., 2011

#2: Martin et al., 2011; Ma et al., 2014

#3: Martin et al., 2011; Hou et al., 2012

#4: Martin et al., 2011; Han et al., 2014

#5: Dhamija et al., 2001; Åberg et al., 2004; Kobayashi et al., 2006; Lee et al., 2013; Ookuma et al., 2013; Kiyoshima et al., 2014

7. 謝 辞

本研究は、九州大学 名誉教授 坂井英隆先生ならびに九州大学大学院歯学
研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学研究分野 教授 清島保先生のご
指導のもと行われたものであり、先生方の終始懇切なるご指導、ご鞭撻ならび
にご高閲に深甚なる謝意を表します。

そして、このような研究の機会を与えて下さいました同研究院 口腔機能修
復学講座 インプラント・義歯補綴学研究分野 教授 古谷野潔先生のご厚意
に感謝致します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を賜りました同研究院 口腔
病理学研究分野 助教 藤原弘明先生を始め、永田健吾先生、和田裕子先生に
深謝致します。

最後に、多くのご協力やご援助を頂きました、九州大学大学院 顎顔面病態
制御学講座 口腔病理学研究分野ならびに口腔機能修復学講座 インプラン
ト・義歯補綴学研究分野の皆様にご心より感謝致します。

8. 参考文献

Åberg T, Wang XP, Kim JH, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Ryoo HM, Thesleff I (2004) Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Dev Biol* 270: 76-93

Akagawa Y, Yoshida M (2012) The impact of prosthodontic care on healthy longevity and minimizing nursing care needs. *Ann Jpn Prosthodont Soc* 4: 397-402

Akhter M, Kobayashi I, Kiyoshima T, Matsuo K, Yamaza H, Wada H, Honda JY, Ming X, Sakai H (2005) Possible functional involvement of thymosin beta 4 in developing tooth germ of mouse lower first molar. *Histochem Cell Biol* 124: 207-213

Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, Fukumoto S (2012) Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem* 287: 10590-10601

Barnejee C, Javed A, Choi JY (2001) Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 N-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* 142: 4026–4039

Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Dimaio JM, Srivastava D (2004) Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 432: 466-472

Brånemark PI (1983) Osseointegration and its experimental background. *Journal of Prosthetic Dentistry* 50: 399-410

Camilleri S, McDonald F (2006) Review Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci* 114: 361-373

Cha HJ, Jeong MJ, Kleinman HK (2003) Role of thymosin beta 4 in tumor metastasis and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 95: 1674-1680

Cha HJ, Philp D, Lee SH, Moon HS, Kleinman HK, Nakamura T (2010) Over-expression of thymosin beta 4 promotes abnormal tooth development and stimulation of hair growth. *Int J Dev Biol* 54: 135-140

Chen S, Gluhak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, Yuan GH, Dong J, Gay I, MacDougall M (2009) Runx2, osx, and dspp in tooth development. *J Dent Res* 88: 904-909

Dhamija S, Krebsbach PH (2001) Role of Cbfa1 in ameloblastin gene transcription. *J Biol Chem* 276: 35159-35164

D'Souza RN, Åberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I (1999) Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 126: 2911-2920

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89: 747-754

Fransson C, Lekholm U, Jemt T, Berglundh T (2005) Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin Oral Implants Res* 16: 440-446

Fransson C, Wennström J, Berglundh T (2008) Clinical characteristics at implants with a history of progressive bone loss. *Clin Oral Implants Res* 19: 142-147

Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, LaFlamme S, Burbelo PD, Goldstein AL (1995) Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells. *J Cell Sci* 108: 3685-3694

Grant DS, Rose W, Yaen C, Goldstein A, Martinez J, Kleinman H (1999) Thymosin beta4 enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Angiogenesis* 3: 125-135

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS* 97: 13625-13630

Han N, Zheng Y, Li R, Li X, Zhou M, Niu Y, Zhang Q (2014) β -catenin enhances odontoblastic differentiation of dental pulp cells through activation of Runx2. *PLoS ONE* 9: e88890

Hannappel E, Huff T (2003) The thymosins. Prothymosin alpha, parathymosin, and beta-thymosins: structure and function. *Vitam Horm* 66: 257-296

Hou X, Shen Y, Zhang C, Zhang L, Qin Y, Yu Y, Wang L and Sun X (2012) A specific oligodeoxynucleotide promotes the differentiation of osteoblasts via ERK and p38 MAPK Pathways. *Int J Mol Sci* 13: 7902-7914

Hu Y, Du Y, Jiang H, Jiang GS (2014) Cerium promotes bone marrow stromal cells migration and osteogenic differentiation via Smad1/5/8 signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 7: 5369-5378

Huff T, Müller CS, Otto AM, Netzker R, Hannappel E (2001) β -Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 205-220

Huff T, Rosorius O, Otto AM, Muller CS, Ballweber E, Hannappel E, Mannherz HG (2004) Nuclear localization of the G-actin sequestering peptide thymosin beta4. *J Cell Sci* 117: 5333-5341

Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Teruko TY, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T (2009) Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *PNAS* 106: 13475-13480

Jackson AL, Linsley PS (2004) Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet* 20: 521-524

Jadlowiec JA, Zhang X, Li J, Campbell PG, Sfeir C (2005) Extracellular matrix-mediated signaling by dentin phosphophoryn involves activation of the Smad pathway independent of bone morphogenetic protein. *J Biol Chem* 281: 5341-5347

Kiyoshima T, Fujiwara H, Nagata K, Wada H, Ookuma YF, Shiotsuka M, Kihara M, Hasegawa K, Someya H, Sakai H (2014) Induction of dental epithelial cell differentiation marker gene expression in non-odontogenic human keratinocytes by transfection with thymosin beta 4. *Stem Cell Res* 12: 309-322

Kobayashi I, Kiyoshima T, Wada H, Matsuo K, Nonaka K, Honda JY, Koyano K, Sakai H (2006) Type II/III Runx2/Cbfa1 is required for tooth germ development. *Bone* 38: 836-844

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764

Kumamoto H, Ooya K (2007) Immunohistochemical detection of phosphorylated Akt, PI3K and PTEN in ameloblastic tumors. *Oral Dis* 13: 461-467

Lang NP, Berglundh T (2011) Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Where are we now? –Consensus of Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 38 (suppl 11): 178-181

Lee SI, Kim DS, Lee HJ, Cha HJ, Kim EC (2013) The role of thymosin beta 4 on odontogenic differentiation in human dental pulp cells. *PLoS ONE* 8: e61960

Ma P, Gu B, Xiong W, Tan B, Geng W, Li J, Liu H (2014) Glimepiride promotes osteogenic differentiation in rat osteoblasts via the PI3K/Akt/eNOS pathway in a high glucose microenvironment. *PLoS ONE* 9: e112243

Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK (1997) Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 11: 474-481

Malinda KM, Sidhu GS, Mani H, Banaudha K, Maheshwari RK, Goldstein AL (1999) Thymosin beta4 accelerates wound healing. *J Invest Dermatol* 113: 364-368

Martin JW, Zielenska M, Stein GS, van Wijnen AJ, Squire JA (2011) Review article: The role of RUNX2 in osteosarcoma oncogenesis. *Sarcoma* Volume 2011

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS* 100: 5807-5812

Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89: 773-779

Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T (2007) The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* 4: 227-230

Ookuma YF, Kiyoshima T, Kobayashi I, Nagata K, Wada H, Fujiwara H, Yamaza H, Nonaka K, Sakai H (2013) Multiple functional involvement of Thymosin beta-4 in tooth germ development. *Histochem Cell Biol* 139: 355-370

Philp D, Badamchian M, Scheremeta B, Nguyen M, Goldstein AL, Kleinman HK (2003) Thymosin beta 4 and a synthetic peptide containing its actin-binding domain promote dermal wound repair in db/db diabetic mice and in aged mice. *Wound Repair Regen* 11: 19-24

Philp D, Nguyen M, Scheremeta B, St-Surin S, Villa AM, Orgel A, Kleinman HK, Elkin M (2004) Thymosin beta4 increases hair growth by activation of hair follicle stem cells. *FASEB J* 18: 385-387

Remedios D, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ (2003) Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilament. *Physiol Rev* 83: 433-473

Shiotsuka M, Wada H, Kiyoshima T, Nagata K, Fujiwara H, Kihara M, Hasegawa K, Someya H, Takahashi I, Sakai H (2013) The expression and function of thymosin beta 10 in tooth germ development. *Int J Dev Biol* 57: 873-883

Shi S, Bartold P M, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S (2005) The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 8: 191-199

Smart N, Bollini S, Dube KN, Vieira JM, Zhou B, Davidson S, Yellon D, Riegler J, Price AN, Lythgoe MF, Pu WT, Riley PR (2011) De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 474: 640-644

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Shi S, Wang S (2006) Mesenchymal Stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE* 1: e79

Sosne G, Chan CC, Thai K, Kennedy M, Szliter EA, Hazlett LD, Kleinman HK (2001) Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators in vivo. *Exp Eye Res* 72: 605-608

Sosne G, Szliter EA, Barrett R, Kernacki KA, Kleinman H, Hazlett LD (2002) Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation in vivo following alkali injury. *Exp Eye Res* 74: 293-299

Sosne G, Xu L, Prach L, Mrock LK, Kleinman HK, Letterio JJ, Hazlett LD, Kurpakus-Wheaton M (2004) Thymosin beta 4 stimulates laminin-5 production independent of TGF-beta. *Exp Cell Res* 293: 175-183

Sosne G, Qiu P, Goldstein AL, Wheaton M (2010) Biological activities of thymosin beta4 defined by active sites in short peptide sequences. *FASEB J* 24: 2144-2151

Xiao ZS, Thomas R, Hinson TK, Quarles LD (1998) Genomic structure and isoform expression of the mouse, rat and human Cbfa1/Osf2 transcription factor. *Gene* 214: 187-197

Yamaza H, Matsuo K, Kiyoshima T, Shigemura N, Kobayashi I, Wada H, Akamime A, Sakai H (2001) Detection of differentially expressed genes in the early development stage of the mouse mandible. *Int J Dev Biol* 45: 675-680