

博士論文

歯冠形態形成における Hippo 伝達経路制御機構の解明

二木正晴

平成 26 年度提出

東北大学

要 約

Mammalian STE20-like kinase1/2 (Mst1/2)は哺乳類における Hippo 伝達経路に属する分子であり,その下流にある転写補助因子である Yes-associated protein (YAP)をリン酸化することにより細胞増殖に関与し,器官の大きさを制御する。近年,Hippo 伝達経路は細胞増殖に関与するだけでなく,細胞分化や細胞形態の制御,細胞極性,幹細胞における自己再生能など多彩な生命現象に関与していることが報告されている。今回,我々は歯の発生過程における Hippo 伝達経路の役割についての検討を行った。まず,マウス胎生 17.0 日齢 (E17.0) 歯胚とラット歯原性上皮細胞株 SF2 とマウス歯乳頭由来間葉系細胞株 mDP より mRNA を抽出し RT-PCR 法を用いて Hippo 伝達経路関連分子群の発現解析を行なった。その結果,歯胚と歯原性細胞において Hippo 伝達経路関連分子群の mRNA の発現を認めた。また,哺乳類における Hippo 伝達経路において中心的役割を担う Mst1/2 の歯胚での発現局在について解析するために,マウス胎生 13.5 日齢 (E13.5), 14.5 日齢 (E14.5), 16.0 日齢 (E16.0) の歯胚切片を用いて免疫組織学的に検討した。その結果,Mst1 と Mst2 は蕾状期と鐘状期において同様の発現様式を示すが,帽状期では異なる発現様式を示した。このことより,歯の発生過程において Mst1 と Mst2 は歯胚の分化段階により異なる役割を果たしていることが示唆された。次に SF2 細胞における細胞密度と Mst1/2 の発現局在との関係について免疫組織学的に検討した。その結果,Mst1 の発現局在は細胞密度により異なり,細胞密度が疎な状態では核に局在し,細胞密度が密な状態では細胞質に局在することが確認された。一方,Mst2 は細胞密度に関わらず細胞質に発現していることが確認さ

れた。これらの結果より、歯原性上皮細胞において Mst1 と Mst2 は異なる機能を持つことが示唆された。さらに、SF2 細胞における Mst1/2 の細胞増殖・細胞分化における関係について解析するため、Mst1/2 の過剰発現系と発現抑制系を用いて解析を行なった。その結果、Mst1/2 過剰発現系では細胞増殖抑制と細胞分化促進が認められた。一方、Mst1/2 発現抑制系では細胞増殖促進と細胞分化抑制が認められた。さらに、Mst1/2 過剰発現系では TUNEL 染色による解析より、アポトーシスを起こしている細胞の存在が確認された。これらの結果より、Mst1 と Mst2 は歯原性上皮細胞の細胞増殖と細胞分化において重要な役割を担うことが示唆された。また、SF2 細胞における NT-4 刺激により、Mst1/2 の mRNA の発現促進と Mst1/2 のリン酸化が起こることが確認されたが、この際起こるリン酸化は MEK 阻害剤である U0126 と PD98059 処理により、Mst1/2 リン酸化は阻害された。このことは、ERK1/2 が Mst1/2 のリン酸化に関与することを示唆する。そこで、ERK1/2 と Mst1/2 の結合解析を行なうため、SF2 細胞における Mst1, Mst2 過剰発現細胞株を NT-4 で刺激後、抽出したタンパクを抗 DDK 抗体を用いて免疫沈降し、抗 ERK1/2 抗体により Mst と ERK1/2 の結合についてウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、SF2 細胞における NT-4 刺激により、ERK1 は Mst1 と直接結合していることが確認された。また、SF2 細胞へのリコンビナントタンパク発現ベクターを用いた導入による解析より、ERK1 は Mst1 の N 末端側に存在する触媒領域に結合することが確認された。以上の結果より、SF2 細胞における NT-4 による刺激は TrkB, ERK1 を介し伝達し、ERK1 が Mst1 の N 末端側に存在する触媒領域に結合することにより Mst1 がリン酸化し、また *Mst1*, *Mst2*, *Ambn* の mRNA の発現が促進されることが明らかとなった。

緒 言

全ての器官発生の過程において、器官の成長に伴う大きさの制御には細胞増殖が大きく関与している。この際起こる細胞増殖は非常に精密に制御され、正常発生において機能的な器官形成のために様々な成長因子や伝達シグナルが複雑に関与し、適切な細胞増殖や細胞移動が起こる。Hippo 伝達経路は多数の分子より構成されており、ショウジョウバエの場合 Ste20 ファミリーである Hippo (hpo), Ww 領域アダプタータンパクである Salvador (Sav), 腫瘍抑制因子である Mats (mats), NDR キナーゼである Warts (Wts) などの中心的役割を果たす分子と、それらの下流で核移行することにより転写因子を活性化する Yorkie (ykiq) などから構成される (Pan D 2007)。Hippo 伝達経路はショウジョウバエにおいて発見された伝達経路で、この伝達経路が活性化状態である場合には、核移行タンパクで転写補助因子である Yorkie が Hippo・Salvador 複合体により活性化された Mats・Warts 複合体にリン酸化されることにより、Yorkie の核移行が阻害され、細胞増殖を抑制的に制御する (Kango-Singh M and Singh A. 2009)。また、これらのホモログは下等生物から哺乳類まで保存され、ほぼ全ての器官に発現している。Mammalian STE20-like kinase1/2 (Mst1/2)は、sterile 20 (STE20) ファミリーに属するプロテインキナーゼであり、哺乳類における Hippo 伝達経路において中心的役割を果たす分子である (Ling P 2008)。哺乳類における Hippo 伝達経路は、Mst1/2 (hippo homolog), Ww45 (Salvador homolog), Lats (Warts homolog), Mobs (Mats homolog), そして核移行タンパクである YAP (Yorkie homolog) などで構成される。Hippo 伝達経路が活性化状態ではない場合には、YAP

は細胞質から核内に移動し転写因子である Tead と結合し細胞増殖を促進する。一方, 上流因子により Hippo 伝達経路が活性化されると Mst1/2 と Ww45 の複合体はその下流にある Mobs と Lats 複合体をリン酸化する。その後, この複合体が YAP をリン酸化することにより YAP の核移行が起こらず細胞質内に留まり, その後ユビキチン化され分解される (Kango-Singh M and Singh A. 2009)。Hippo 伝達経路が正常に機能しない典型的例が腫瘍であり, 現在様々な器官における腫瘍について本伝達経路との関連について研究がなされている。これまで, 肝癌 (Zhou D et al., 2009), 肺癌 (Xu CM et al., 2013), 胃癌 (Zhang J et al., 2011), 乳癌 (Chen D et al., 2012), 結腸直腸癌 (Konsavage WM Jr et al., 2012), 前立腺癌 (Li W et al., 2011) などについて Hippo 伝達経路との関連が報告されている。このように近年 Hippo 伝達経路に関する研究が進む中, Hippo 伝達経路の上流因子を中心にますます多くの新規構成因子が報告されている。例えば, プロトカドヘリンである Fat は細胞質表面でプロトカドヘリンである Dachous1/2 と複合体を形成し細胞外からのシグナルを細胞内へ伝達する (Sopko R et al., 2009)。また, Kibra, Expanded, Merlin は Hippo 伝達経路の上流で複合体を形成しシグナルをさらに下流へ伝達する (Yu J et al., 2010)。また, Hippo 伝達経路が仲介役となり, 他の伝達経路とクロストークすることが報告されており, YAP が β カテニンと結合し Wnt のターゲット遺伝子の発現を抑制すること (Imajo M et al., 2012) や, Yap が Notch リガンドである Jagged-1 の発現を促進しヒトの肝細胞癌において Notch signaling pathway を活性化する経路 (Tschaharganeh DF et al., 2013), また Yap が Hedgehog signaling pathway を介して神経分化に関与している経路 (Lin YT et al., 2012) などがある。さら

に, ショウジョウバエの p53 は DNA 損傷に対して反応し細胞死を促進する経路も報告されている (Colombani J et al., 2006)。しかしながら, Hippo 伝達経路は多数の分子が関与し, また他の多くの伝達経路と複雑にクロストークしているため, 本伝達経路についての全容は現在のところ明らかではない。

このため, Hippo 伝達経路に関する研究は, この伝達経路が発見された当初細胞分裂, 細胞増殖を制御する機能に関与する研究が中心だった。しかしながら, 近年本伝達経路は, 細胞増殖以外の多くの生体现象に関与していることが明らかになってきている。大脳神経系や腸管では細胞分化に関与している (Mikeladze-Dvali T et al., 2005)。また, Hippo 伝達経路は細胞形態や細胞極性に関与している (Fang X and Adler PN 2010)。また, ショウジョウバエにおける成熟神経細胞の樹状突起の維持に関与している (Emoto K et al., 2006)。さらに, YAP は ES 細胞における幹細胞の自己再生と細胞分化に関与 (Lian I et al., 2010) し, Mst1 は心筋細胞におけるアポトーシスに関与している (Yamamoto S et al., 2003)。このように, Hippo 伝達経路は多くの臓器において非常に多彩な機能が報告されているが, 現在のところ, 歯の発生過程に関する報告は皆無である。そこで本研究では歯の発生過程における Hippo 伝達経路関連分子群の発現とその役割について解析を行なった。さらに, 歯原性上皮細胞における Hippo 伝達経路活性化因子についての解析と, そのシグナル経路の解析を行なった。

材料および方法

1, 細胞培養

ラット歯原性上皮由来細胞株 SF2 細胞, およびマウス歯原性間葉由来細胞株 mDP は Dulbecco' s modified Eagle' s medium/F12 (DMEM-F12) (Invitrogen) に 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen), および抗生物質 (ペニシリン 50 unit/ml, ストレプトマイシン 50 unit/ml, アンフォテリシン 12.5 ug/ml) (Invitrogen) を添加したものを培養培地として用い, 37 °C, 5% の CO₂ 下で培養した (Wu et al., 2010)。

2, RNA 抽出および RT-PCR 法, Real time PCR 法

Total RNA は, 歯胚および培養細胞より TRIzol® Reagent (Invitrogen) を用いて抽出し, SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を使用して cDNA を合成した。その後, taq DNA polymerase High Yield (greiner bio-one), 10 × Taq Reaction Buffer Complete (greiner bio-one), dNTP Mix (greiner bio-one), MgCl₂ stock solution (greiner bio-one) に各 cDNA とプライマーを加え, サーマルサイクラー (Applied Biosystems) を用いて, PCR 増幅産物を作成した。PCR 増幅産物は 2% アガロースゲルを用いて泳動, サイバーグリーン染色後, LAS-4000mini (FUJIFILM) を用いて検出した。また, 同様に合成した cDNA と各プライマーを SYBR® Select Master Mix (Invitrogen) 2 加え, TaqMan 7700 sequencer detection system (Applied Biosystems) を用いて Real time PCR を行なった。なお, 相対遺伝子発現は GAPDH により補正を行なった。

3, 組織および歯原性上皮細胞の免疫染色法

歯胚切片は、胎生 13.5 日齢, 14.5 日齢, 16.0 日齢の ICR マウスを用いて、切片の作成を行った。歯胚切片は、4%paraformaldehyde(Wako)/PBS で 24 時間固定した後、10%, 20%, 30%スクロース水溶液に 12 時間ずつ浸漬した後、組織を OCT compound(Sakura Finetechnical Co.)にて封入し、クライオスタット (CM3050, Leica, Inc.) を使用して作製した凍結切片を染色に用いた。組織切片作製後、4% Paraformaldehyde(Wako)/PBS にて 10 分間固定した後、PBS にて 5 分間 3 回洗浄、0.1%Triton X-100(Wako)/PBS による処理、PBS 洗浄、L.A.B solution (Polysciences) による賦活化、PBS 洗浄の後 1×Universal Blocking Reagent™(BioGenex)/PBS にてブロッキングを行い、洗浄後 1 次抗体で 1 時間染色した。その後 PBST にて 5 分間×3 回洗浄、2 次抗体と Hoechst33342 dye (invitrogen) で 1 時間染色し、再び PBST で 5 分間×3 回洗浄、純水にて 1 回洗浄後、Fluoromount (Diagnostic BioSystems) で封入した。また、SF2 細胞の免疫染色は、直系 15mm のスライドガラス (MATSUNAMI) の上で培養した細胞を、4% paraformaldehyde(Wako)/PBS にて 10 分間固定後、PBS で 5 分間×3 回洗浄、L.A.B solution による賦活化、また PBS にて洗浄、1×Universal Blocking Reagent™/PBS にてブロッキング、洗浄後 1 次抗体で 1 時間染色を行った。PBST で 5 分間×3 回洗浄後、2 次抗体と Hoechst33342 dye で 1 時間染色を行った。その後 PBST で 5 分間×3 回洗浄、純水にて 1 回洗浄後、Fluoromount を用いて封入した。1 次抗体には、抗-Mst1 抗体 (LSBio)、抗-Mst2 抗体 (LSBio)、抗-YAP 抗体 (Invitrogen)、2 次抗体には Alexa flow® 488 抗-Rabbit IgG 抗体 (Invitrogen)、Alexa flow 594®抗-Rabbit IgG 抗体 (Invitrogen) を使用した。また、核染色には

Hoechst33342 dye を使用した。その後, BZ-8000 蛍光顕微鏡 (Biozero, KEYENCE Co, Osaka, Japan) を用いて検鏡し BZ-Analyzer (KEYENCE) で解析した。

4, 発現ベクターを用いた Mst1/2 過剰発現細胞の作成

マウス Mst1 と Mst2 の発現ベクターは ORIGENE 社より購入した。SF2 細胞を 6 cm dish に 30%コンフルエントになるように蒔き, DMEM-F12 (Invitrogen), 10% FBS (Invitrogen), および抗生物質 (ペニシリン 50 unit/ml, ストレプトマイシン 50 unit/ml, アンフォテリシン 12.5 ug/ml) (Invitrogen) を添加した培地 24 時間培養後, DMEM-F12 (Invitrogen), 10%FBS (Invitrogen) 培地に交換し 24 時間培養した後, Lipofectamine® LTX reagent (Invitrogen) を用いて遺伝子導入を行なった。その後 37 °C, 5%の CO₂ 下で, 48 時間培養し各実験に用いた。

5, siRNA- Mst1/2 を用いた Mst1/2 抑制発現細胞の作成

ラット Mst1 と Mst2 の RNAi は Invitrogen 社より購入した。SF2 細胞を 6 cm dish に 30%コンフルエントになるように蒔き, DMEM-F12 (Invitrogen), 10%FBS (Invitrogen), および抗生物質 (ペニシリン 50 unit/ml, ストレプトマイシン 50 unit/ml, アンフォテリシン 12.5 ug/ml) (Invitrogen) を添加した培地 24 時間培養後, DMEM-F12 (Invitrogen), 10%FBS (Invitrogen) 培地に交換し 24 時間培養した後, Lipofectamine® RNAiMAX reagent (Invitrogen) を用いて遺伝子導入を行なった。ネガティブコントロールとして Stealth RNAi™ negative control (Invitrogen) を用いた。siRNA- Mst1/2 導入後 37 °C, 5%の CO₂ 下で, 48 時間培養し各実験に用いた。

6. 歯原性上皮細胞における増殖実験

SF2 細胞を 1×10^3 cell/96 well plate に蒔き, Mst1/2 発現ベクターあるいは siRNA- Mst1/2 を遺伝子導入し 48 時間培養後, Cell Counting Kit-8(DOJINDO) を加え, 吸光度測定を行いコントロール群との比較を行った。さらに, 5' -Bruno-2' -deoxyuridine (BrdU) Labeling & Detection Kit II (Roche) を用いた細胞増殖能の検討を行った。直径 15mm のスライドガラス上で 50~60% コンフルエントになるまで SF2 細胞を培養し, その後 BrdU 標識試薬にて 1 時間インキュベート, PBS にて 10 分×3 回洗浄, 70%エタノールで固定した。抗 BrdU ワーキング溶液にて 37 °C で 30 分インキュベート, PBS で洗浄後, フルオレセイン標識抗マウス Ig 抗体溶液にて 30 分インキュベートした。PBST で洗浄後, Propidium Iodide (Vecta) で封入し, BZ-8000 蛍光顕微鏡 (KEYENCE) を用いて検鏡し, BrdU 陽性細胞を計測した。

また, SF2 細胞における BrdU と抗 YAP 抗体の二重染色は, スライドガラス上の SF2 細胞を BrdU 標識試薬にて 1 時間インキュベート, PBS にて 10 分×3 回洗浄, 70%エタノールで固定した後, 抗 BrdU ワーキング溶液に抗 YAP 抗体を加えて 1 時間染色をおこなった。その後 Alexa flow 488[®] 抗-Mouse IgG 抗体 (Invitrogen), Alexa flow 594[®] 抗-Rabbit IgG 抗体 (Invitrogen) と Hoechst33342 dye (Invitrogen) 溶液に 1 時間インキュベートした。PBST で洗浄後, 純水にて 1 回洗浄, Fluoromount (Diagnostic BioSystems) で封入した。BZ-8000 蛍光顕微鏡 (Biozero, KEYENCE Co, Osaka, Japan) を用いて検鏡し, BrdU 陽性細胞と YAP 陽性細胞を計測した。

7, ウェスタンブロッティング法

SF2 細胞を 6 cm dish に 1.0×10^5 cells/a になるように蒔き, 24 時間培養後, その後 1 時間 DMEM-F12 に抗生物質 (ペニシリン 50 unit/ml, ストレプトマイシン 50 unit/ml, アンフォテリシン 12.5 ug/ml) を添加した培地で培養後, 100 ng/ml NT-4 を 0, 5, 15, 30, 60, 120 分間添加して 37 °C で刺激した。刺激後 1 mM バナデート/PBS で 3 回洗浄後, プロテアーゼインヒビター (Aprotinin; Loche, Leupeptin; Loche, PMSF; 和光純薬) を添加した Cyto Buster™ Protein Extraction Reagent (Novagen) を加えた後, 4 °C で 10 分間インキュベートした後, サンプルを回収し 4 °C, 12000rpm で遠心分離した。その後, 上清を回収し, NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen) を加えて 70 °C 10 分間熱処理をした。SDS 化したサンプルを NUPAGE®4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) を用いて泳動しシグナル解析を行った。用いた抗体は抗 Mst1 抗体 (LSBio), 抗 Mst2 抗体 (LSBio), 抗 Phospho-Mst1/2 抗体 (cell signaling technology), 抗 ERK1/2 抗体 (cell signaling technology), 抗 Phospho-ERK1/2 抗体 (cell signaling technology), 抗 Akt 抗体 (cell signaling technology), 抗 Phospho-AKT 抗体 (cell signaling technology), 抗 DDK 抗体 (ORIGENE), 抗 V5 抗体 (Invitrogen), および二次抗体として抗 rabbit IgG HRP-conjugated (R&D SYSTEMS) 抗体を使用した。その後, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて可視化し LAS4000mini (GE Healthcare) にて解析を行なった。

8, TUNEL 染色によるアポトーシス解析実験

SF2 細胞に発現ベクターを遺伝子導入した後, 37 °C, 5%の CO₂ 下で 48 時間培

養した。その後、培養細胞を Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® Imaging Assay (Invitrogen) を用いて TUNEL 染色を行なった。TUNEL 染色後、抗-DDK 抗体 Dylight 488 (ORIGENE) により二重染色を行い、BZ-8000 蛍光顕微鏡 (Biozero, KEYENCE Co, Osaka, Japan) を用いて検鏡し BZ-Analyzer (KEYENCE) で解析し、それぞれ TUNEL 陽性細胞と DDK 陽性細胞の数を計測した。

9, タンパク機能阻害剤を使用したシグナル解析

SF2 細胞を 6cm dish に 60%コンフルエントになるように培養し、その後 1 時間 DMEM-F12 に抗生物質 (ペニシリン 50 unit/ml, ストレプトマイシン 50 unit/ml, アンフォテリシン 12.5 ug/ml) を添加した培地で培養後、SF2 細胞を 100ng/ml NT-4 で刺激した。その際、交換培地に阻害剤として、1 μ M Akt Inhibitor VIII (1,3-Dihydro-1-(1-((4-(6-phenyl-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-yl)phenyl)methyl)-4-piperidinyl)-2H-benzimidazol-2-one) (Calbiochem), 10 μ M U0126 (Cell signaling), 100 μ M PD98059 (Calbiochem) を加えた。100ng/ml NT-4 で刺激後、0, 5, 15, 30 分後にタンパクを回収し、その後ウエスタンブロッティングにより Mst1/2, ERK1/2, Akt のリン酸化について解析した。

10, 免疫沈降

SF2 細胞を 6cm dish に 30%コンフルエントになるように培養し、Mst1/2 発現ベクターを SF2 細胞に Lipofectamine® LTX reagent (Invitrogen) により遺伝子導入し、48 時間培養した後 100 ng/ml NT-4 を 0, 5, 15, 30 分間添加して 37 °C で刺激した後、それぞれタンパクを回収した。その後、Dynabeads Protein G

(Invitrogen)を用いて免疫沈降を行なった。また、リコンビナントタンパク発現ベクターを Lipofectamine® LTX reagent (Invitrogen)により SF2 細胞に遺伝子導入し 48 時間培養した後回収したタンパクを Anti-His-tag mAb-Magnetic beads (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES) により免疫沈降を行なった。抗原と抗体の結合反応は、回転下、4 °C で 12 時間行なった。それぞれ、免疫沈降後各実験を行なった。

11, リコンビナントタンパク発現ベクターの作成および導入

SF2 細胞より抽出した cDNA を用いて、各目的タンパクを翻訳した PCR 産物をそれぞれ PCR 法にて抽出し、QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) により PCR 産物を精製した後、pEF6/V5-His-TOPO®Vector (Invitrogen) に組み込んだ。作製したベクターの塩基配列をシーケンスにより確認後、Lipofectamine® LTX reagent (Invitrogen) を用いて SF2 細胞に遺伝子導入した。その後、37 °C、5% の CO₂ 下で 48 時間培養し、各実験に用いた。

結 果

Hippo 伝達経路関連分子群の歯胚における mRNA 発現と Mst1/2 の発現局在

歯胚における Hippo 伝達経路関連分子群の発現を解析するために、マウス胎生 17.0 日齢 (E17.0) 歯胚より mRNA を抽出し、RT-PCR 法により解析を行った。この結果、Hippo 伝達経路関連分子群である *Mst1*, *Mst2*, *Ww45*, *Lats*, *Mob*, *Yap* は、歯胚において発現を認めた (図 1A)。また、関連分子群のなかでも伝達経路において中心的役割を担う Mst1/2 の歯胚発生過程における発現局在を明らかにするために、歯胚発生の特徴的な段階である蕾状期、帽状期、鐘状期の 3 つの段階における Mst1/2 の発現について、マウス胎生 13.5 日齢 (E13.5) , 14.5 日齢 (E14.5) , 16.0 日齢 (E16.0) の歯胚切片を用いて、Mst1/2 の局在について免疫組織学的に検討した。その結果、帽状期では Mst1, Mst2 とともに頬側では上皮細胞、間葉細胞のどちらにも発現していることが確認されたが、舌側ではエナメル上皮での発現を認めなかった。また、帽状期では Mst1 は内エナメル上皮と外エナメル上皮で発現が認められなかったが、Mst2 はエナメル上皮細胞と間葉細胞の双方に発現が認められた。さらに、鐘状期においては Mst1, Mst2 とともに上皮細胞、間葉細胞のいずれにおいても発現を認めた (図 1B)。

歯原性細胞での Hippo 伝達経路関連分子群の mRNA 発現と Mst1/2 の発現局在

歯原性細胞における Hippo 伝達経路関連分子群の発現を解析するために、ラット歯原性上皮細胞株 SF2, マウス歯乳頭由来間葉系細胞株 mDP より mRNA を抽出し、RT-PCR 法により Mst1/2 の発現解析を行った。その結果、mDP 細胞では

Mst1/2, Ww45, Lats, Mob, Yap の mRNA の発現が認められたが, SF2 細胞では *Ww45* の発現は認められなかった (図 2A)。さらに, SF2 細胞において細胞密度と Mst1, Mst2 の細胞局在との関係について, 免疫組織学的に検討した。その結果, Mst1 は細胞密度が低い状態では核内に発現し, 細胞密度が高くなると細胞質に局在していることが確認された。一方, Mst2 は細胞密度に関わらず細胞質に局在していることが確認された (図 2B)。さらに SF2 細胞, mDP 細胞における細胞密度と Mst1/2 の下流分子である YAP の発現局在との関係について, 免疫組織学的に検討した。その結果, SF2 細胞と mDP 細胞のいずれにおいても, YAP は細胞密度が低い状態では核内に発現し, 細胞密度が高くなると細胞質に局在していることが確認された。(図 3)

歯原性上皮細胞における YAP と細胞増殖と細胞分化との関係

歯原性上皮細胞株 SF2 の細胞塊における細胞分化について免疫組織学的に検討した。その結果, SF2 細胞塊においては細胞塊の外側周辺の細胞では p75 が発現しているのに対し, 細胞塊の中心付近の細胞ではアメロブラスチン (Ambn) の発現が認められた (図 4A)。さらに, SF2 細胞における細胞増殖と YAP の関係を明らかにするために, SF2 細胞に BrdU を取り込ませ, 抗 BrdU 抗体と 抗 YAP 抗体で二重染色を行い, BrdU 陽性細胞と YAP 陽性細胞を計測し, これらの陽性細胞が一致する頻度を解析した (図 4B)。その結果, BrdU 陽性細胞と YAP 陽性細胞が高頻度で一致していることが明らかとなった。(図 4C)

Mst1/2 が歯原性上皮細胞の細胞増殖, 細胞分化, アポトーシスに与える影響

Mst1/2 による歯原性上皮細胞において細胞増殖や細胞分化に与える影響について解析を行なうために, ラット歯原性上皮細胞株 SF2 に Mst1/2 発現ベクターと siRNA- Mst1/2 をそれぞれ遺伝子導入し Mst1/2 過剰発現細胞株 (図 5A) と Mst1/2 抑制細胞株 (図 5B, C) における細胞増殖と細胞分化について検討した。その結果, Mst1/2 過剰発現系では細胞増殖の抑制 (図 5D) と細胞分化の促進が確認された (図 6A)。これに対し, Mst1/2 抑制した細胞では細胞増殖の亢進 (図 5D) と, 細胞分化の抑制が確認された (図 6B)。さらに, Mst1/2 が歯原性上皮細胞におけるアポトーシスに与える影響について解析するために, SF2 細胞に Mst1/2 発現ベクターを遺伝子導入し 48 時間培養した後, TUNEL 染色を行い, その後抗 DDK 抗体により二重染色を行なった。その結果, SF2 細胞において Mst1/2 を過剰発現させた場合, アポトーシスを起こしている細胞の存在が確認された (図 7A)。また, DDK 陽性細胞の中で TUNEL 染色陽性細胞の確率は約 60%程度であったのに対し, TUNEL 陽性細胞の中で DDK 陽細胞の確率は 90%を超えていることが確認された。(図 7B)

歯原性上皮細胞における Hippo 伝達経路活性化因子

歯原性上皮細胞において, Hippo 伝達経路を活性化する上流因子として, 我々は NT-4 に着目した。これまで我々は NT-4 が, TrkB-ERK1/2 シグナルを介し, SF2 細胞の増殖を抑制し, エナメル芽細胞への分化を促進することを報告している (Yoshizaki, et al. 2008)。今回, 100ng/ml NT-4 で SF2 細胞を刺激し 48 時

間後 mRNA を抽出し *Mst1*, *Mst2* の mRNA の発現について RT-PCR 法により解析した。その結果, コントロール群と比較して *Mst1*, *Mst2* の mRNA の発現が促進されることを確認した (図 8)。

歯原性上皮細胞における *Mst1/2* のシグナル伝達経路の解析

RT-PCR 法による解析より NT-4 刺激により SF2 細胞において *Mst1/2* の mRNA の発現が促進されることを確認した。そこで, 歯原性上皮細胞における NT-4 刺激による Hippo 伝達経路の役割を明らかにするため, SF2 細胞を 100 ng/ml NT-4 を 0, 5, 15, 30, 60, 120 分間添加して 37 °C で刺激した後, *Mst1/2* と ERK1/2 のリン酸化をウエスタンブロッティング法にて検討した。その結果, *Mst1/2* は NT-4 刺激 15 分後にリン酸化され, リン酸化はその後持続することが確認された。また, ERK1/2 は NT-4 刺激後 5 分と 30 以降にリン酸化されることが確認された (図 9A)。次に, NT-4 による *Mst1/2* のリン酸化がどのような経路を介しているか解析するために Akt 阻害剤と MEK 阻害剤により処理した SF2 細胞を NT-4 で刺激し, この際の *Mst1/2* のリン酸化をウエスタンブロッティング法にて検討した。その結果, Akt 阻害剤で処理した SF2 細胞株はコントロール同様に *Mst1/2* がリン酸化されたのに対し, MEK 阻害剤で処理した細胞株は *Mst1/2* のリン酸化が認められなかった (図 9B)。

歯原性上皮細胞における NT-4 刺激による *Mst1* と ERK1 の結合

歯原性上皮細胞における NT-4 刺激により, ERK1/2 を介し *Mst1/2* がリン酸化されることが確認された。そこで, 歯原性上皮細胞における NT-4 刺激により

ERK1/2 が直接 Mst1/2 に結合するか解析するために、Mst1 および Mst2 のそれぞれを過剰発現させた SF2 細胞株を 100 ng/ml NT-4 を 0, 5, 15, 30 分間添加して 37 °C で刺激した後、DDK 抗原による免疫沈降を行った。その後、回収したタンパクを抗 ERK1/2 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、Mst2 過剰発現細胞株においては NT-4 刺激後タンパクの結合に変化は認められない (図 10C) が、Mst1 過剰発現細胞株では NT-4 刺激後 ERK1 のみの結合となることが確認された (図 10B)。このことより、ERK1 は Mst 1 と直接結合していることが明らかになった。さらに、ERK1 が Mst1 のいずれの領域に結合するか解析するために、Mst1 のリコンビナントタンパクに His₆ を付与した発現ベクターを作成し SF2 細胞に遺伝子導入し 48 時間培養後タンパクを回収した。これらのタンパクをニッケルビーズにより免疫沈降を行なった後、抗 ERK1/2 抗体を用いてウエスタンブロッティング法による解析を行なった。その結果、ERK1 は Mst1 の N 末端側に存在する触媒領域に結合することが確認された (図 10F)。

考 察

Hippo 伝達経路はショウジョウバエにおいて細胞増殖を抑制し、アポトーシスを促進することにより器官の大きさを規定する伝達経路として発見された (Harvey KF et al., 2003, Fang X and Adler PN 2010)。また, YAP は ES 細胞における幹細胞の自己再生と細胞分化に関与する (Lian I et al., 2010)。さらに, Mst1 は心筋細胞におけるアポトーシスに関与する (Yamamoto S et al., 2003)。このように, 多くの生物あるいは臓器について Hippo 伝達経路の多彩な機能が解明されているが, 歯の発生過程における Hippo 伝達経路の役割について, 現在のところ報告されていない。歯の形態は歯種, 個人差による歯の形態や大きさが多様で, 口腔内で適切に機能する歯の再生技術の臨床応用のためには, 適切な大きさや形態を有する歯の再生技術が必要で, 歯の形態形成の制御機構の解明は重大な課題となる。さらに, Hippo 伝達経路関連分子群は哺乳類のほぼ全ての臓器に発現していることから, 歯の形態形成における新たな知見は他臓器の再生医療にも大きな影響を与える可能性を持つ。そこで, 本研究は歯の発生過程における Hippo 伝達経路の役割について解析を試みた。

まず初めに歯胚における Hippo 伝達経路関連分子群の mRNA の発現を RT-PCR 法により解析し, 中核キナーゼの構成分子である *Mst1/2*, *Ww45*, *Mob*, *Lats*, *Yap* の mRNA の発現を確認した。次に, 哺乳類における Hippo 伝達経路における中核キナーゼの中でも中心的役割を担う Mst1 と Mst2 (Hippo homolog) について, 歯胚の特徴的な発生段階である蕾状期, 帽状期, 鐘状期の 3 段階について免疫組織学的に解析した。その結果, 蕾状期 (E13, 5) では, Mst1, Mst2 はいずれも頰側では上

皮組織と間葉組織のいずれにも発現が認められたが、舌側ではエナメル上皮において Mst1, Mst2 のいずれの発現も認められなかった。また、帽状期 (E14, 5) では Mst2 はエナメル上皮において発現が認められるが、Mst1 は内エナメル上皮と外エナメル上皮のいずれにおいても発現が認められなかった。さらに、鐘状期 (E16. 0) では頬側と舌側のいずれにおいても Mst1, Mst2 は上皮組織, 間葉組織の両組織に発現していることが確認された。これらの結果より, Mst1 と Mst2 は蕾状期において主に歯冠部の頬側の形態や大きさに関与することが示唆される。また、帽状期においては Mst2 が主にエナメル上皮の発生への関与が示唆された。さらに、鐘状期では Mst1, Mst2 とともに上皮組織と間葉組織のいずれにも広範囲で発現していることから、分化が進んだ組織では Mst1/2 とともに発現していることが確認された。

次に、歯原性上皮細胞株 SF2 と歯原性間葉細胞株 mDP について RT-PCR 法により Hippo 伝達経路の mRNA の発現解析を行った結果、間葉細胞では主要な分子は全て発現していたが、歯原性上皮細胞では *Ww45* は確認できなかった。このことは SF2 細胞と mDP 細胞における伝達経路が異なる経路であることを示唆している。さらに、SF2 細胞において細胞密度と Mst1 と Mst2 の発現局在についての関係について免疫組織学的に解析した。その結果、Mst1 は細胞密度が低い場合は核内に発現し細胞密度が高くなると細胞質に発現するのに対し、Mst2 は細胞密度に関係せずに細胞質に発現している。Mst1 は Thr183 のリン酸化と脱リン酸化により細胞質と核内を移動することが報告されている (Lee KK and Yonehara S et. al, 2002) ことより、歯原性上皮細胞において Mst1 と Mst2 は異なるリン酸化形態を持ち、かつ異なる機能を担う可能性を示唆された。

歯胚と歯原性細胞における Hippo 伝達経路関連分子群の発現を確認した後、我々は哺乳類における Hippo 伝達経路の転写補助因子である YAP と細胞増殖との関係について解析した。YAP は Mst1/2 の下流に位置し、転写補助因子として機能 (Bin Zhao et al., 2010) し、Hippo 伝達経路が活性化されていない状態では、YAP は細胞質から核内に移動し転写因子である TEAD と結合し細胞増殖がおこる (Chen L et al., 2010)。SF2 細胞と mDP 細胞を抗 YAP 抗体により免疫組織学的に解析した結果、歯原性細胞において細胞増殖が盛んで細胞密度が低密度な状態では YAP は核内に発現し、細胞増殖が盛んではない細胞密度が密な場合では YAP は細胞質に発現していることが確認された。次に、SF2 細胞塊について歯原性上皮細胞の未分化マーカーである p75 と分化マーカーである Ambn の発現局在について免疫組織学的に検討した。その結果、p75 は細胞塊の外側周辺の細胞で発現し、Ambn は中心付近の細胞に発現していることが確認された。このことより SF2 細胞塊では細胞塊の外側では未分化な細胞が存在し、細胞塊の中心付近では分化した細胞が存在し、この細胞塊は *in vivo* 環境の想定を *in vitro* での分化モデルとして利用することができる。このモデルを利用し、SF2 細胞に BrdU を取り込ませた後、抗 YAP 抗体で二重染色を行ない YAP 陽性細胞と BrdU 陽性細胞の数を計測したところ、YAP 陽性細胞と BrdU 陽性細胞が高頻度で一致していることが確認された。このことより、SF2 細胞において YAP は細胞増殖に関与していることが明らかとなった。また、未分化状態である細胞塊外側の細胞は YAP 陽性細胞が多く、分化細胞塊中心付近の細胞では YAP 陽性細胞は少ないことより、YAP を構成分子とする Hippo 伝達経路は歯原性上皮細胞において細胞増殖のみではなく細胞分化にも関与していることが示唆された。

次に、歯原性上皮細胞における Mst1/2 の機能解析を行なうために、SF2 細胞において Mst1/2 過剰発現系と Mst1/2 抑制系において細胞増殖と細胞分化についての解析を行なった。その結果、Mst1/2 過剰発現系では細胞増殖が抑制され細胞分化が促進されるのに対し、Mst1/2 抑制系では細胞増殖の促進と細胞分化の抑制が認められた。これらの結果より、Mst1/2 は歯原性上皮細胞において細胞増殖と細胞分化に重要な役割を担うことが明らかになった。さらに、Mst1/2 過剰発現細胞株では、TUNEL 染色によりアポトーシスを起こしている細胞の存在が認められた。このことは Mst1/2 過剰発現細胞株において細胞増殖が抑制されることの一因であると考えられる。

次に、我々は歯原性上皮細胞において Hippo 伝達経路を活性化する因子として神経栄養因子である NT-4 に着目した。神経栄養因子は神経細胞の成長促進 (knusel et al., 1991, Chalazonitis et al., 1998), 神経突起伸展 (Tanaka S et al., 2000) や生存維持 (Johnson EC et al., 2009) に関与することが知られているが、神経系組織以外の組織発生や細胞増殖などに関与することが知られており、肺の正常発育 (Ricci A et al., 2004, Garcia-Suarez O et al., 2009) や血管内皮細胞の増殖制御に関与することが知られている (Campos X et al., 2007)。また、これまで著者らの研究グループでは神経栄養因子である NT-4 が TrkB を介し、歯原性上皮細胞株 SF2 の増殖を抑制し、分化を促進することを報告してきた (Yosizaki et al., 2008)。これらのことを背景に、我々は SF2 細胞を 100ng/ml NT-4 により分化誘導を行なった際の、Mst1/2 の mRNA の発現解析を行なった。その結果、Mst1, Mst2 とともに mRNA の発現の促進が認められた。さらに、SF2 細胞における NT-4 刺激による Mst1/2 のリン酸化についてウェスタンブ

ロツティングにより解析を行なった。その結果, Mst1/2 はおよそ 15 分後にリン酸化され, その後リン酸化状態は維持することが確認された。次に, SF2 細胞における NT-4 刺激による Mst1/2 のリン酸化についてシグナル解析を行うため, Akt 阻害剤と MEK 阻害剤で処理した SF2 細胞株を 100ng/ml NT-4 で刺激した。その結果, Akt 阻害剤で処理した SF2 細胞株ではコントロール同様 NT-4 刺激後 15 分後に Mst1/2 いずれもリン酸化されるが, MEK 阻害剤である U0126 と PD98059 で処理した SF2 細胞株では Mst1/2 のリン酸化は認められなかった。これらの結果より, SF2 細胞において NT-4 刺激は ERK1/2 を介して Mst1/2 がリン酸化されることが確認された。また, SF2 細胞において NT-4 は Hippo 伝達経路の活性化因子として機能することが示唆された。

そこで, 次に我々は ERK1/2 と Mst1/2 の結合解析を行なった。Mst1 は N 末端に触媒ドメインを持ち C 末端にロイシンが豊富な核外移行シグナル (NES) と二分された核局在シグナル (NLS) を含む制御領域を有する (Glantschnig H et al., 2002)。この構造は MAP キナーゼである MAPK-activated protein kinase 2 (MAPKAP-2) と類似の構造であり (Lee KK and Yonehara S 2002), MAPKAP-2 は P38MAPK と結合することが知られている (Corrêa SA and Eales KL 2012, Rouse J et al., 1994)。これらのことより, p38 と同様の MAPK である ERK1/2 が MAPKAP-2 と類似の構造を持つ Mst1 と結合する可能性を有する。そこで Mst1, Mst2 のそれぞれを過剰発現させた SF2 細胞株を 100 ng/ml NT-4 刺激後, DDK 抗原による免疫沈降, ウェスタンブロットングを行なった。その結果, ERK1 が Mst1 に直接結合することが確認された。さらに, 我々は ERK1 が Mst1 のいずれの領域に結合しているか解析するため, リコンビナントタンパク発現ベクターを

作成しそれぞれ SF2 細胞に導入後,回収したタンパクを免疫沈降し抗 ERK1/2 抗体によるウエスタンブロッティングにより解析した。その結果,ERK1 は Mst1 の N 末端側に存在する触媒領域に結合していることが確認された。

本研究によって, 歯胚と歯原性細胞において Hippo 伝達経路関連分子群が発現し, それらの中心的役割を担う Mst1/2 が歯原性上皮細胞株 SF2 において細胞増殖と細胞分化の制御に重要な役割を示すことが確認された。また, NT-4 は SF2 細胞において *Mst1/2* の mRNA の発現を促進し, Mst1/2 をリン酸化することから, NT-4 は歯原性上皮細胞において Hippo 伝達経路を活性化することが示唆された。さらに, NT-4 による Mst1/2 のリン酸化のシグナルは, NT-4 刺激により ERK1 が Mst1 の N 末端側に存在する触媒領域に結合することにより Mst1 をリン酸化することが確認された。

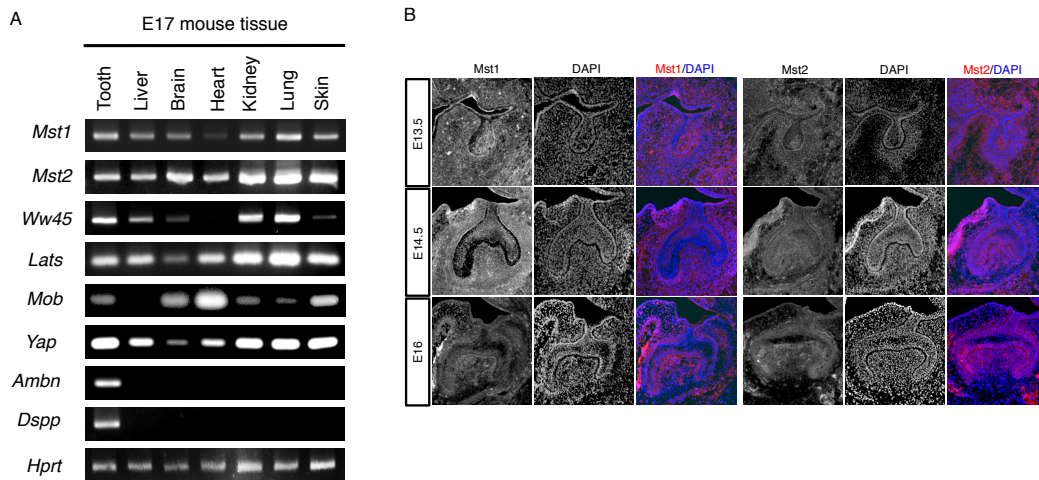
歯の正常発生においては, 歯胚の大きさ・形態の制御とエナメル芽細胞などの分化制御が重要となる。Mst1 と Mst2 は細胞増殖, 細胞分化, アポトーシスに関与し, 歯胚の形態形成制御と分化制御のいずれにも関与することから, 歯の発生過程において Mst1 と Mst2 のいずれも重要であるといえる。しかしながら, Mst1 は Mst2 同様に細胞増殖・細胞分化制御に関与するとともに, NT-4 刺激による ERK1 の結合によりリン酸化されることから, Mst1 は Mst2 と比較してより多くの役割を果たす可能性がある。現在, 歯の正常発生に関わる様々な成長因子が解明され, また歯の再生モデルについての研究が進み, 動物実験では歯の再生に成功している (Nakao K et al., 2012)。さらに, iPS 細胞からエナメル芽細胞 (Arakaki M et al., 2012) や象牙芽細胞 (Otsu K et al., 2012) へ分化誘導を行なうことにも成功している。しかしながら, 歯の再生に要する時間や歯の大きさや形態

制御に関する問題点について解決策となりうる技術は現在のところ報告はない。

口腔内で機能的な歯の再生技術の臨床応用には、多様な形態を有し、個人差の大きい歯の形態を可及的に短期間で再現する技術が重要で必須となる。本研究の結果より Mst1/2 は歯原性上皮細胞において細胞増殖、細胞分化を制御することにより、歯胚発生においてエナメル芽細胞増殖・分化の制御や細胞増殖に関与することで歯胚の大きさや形態の規定に関与することが明らかとなった。Mst1/2 を含めた Hippo 伝達経路関連分子群の応用により短期間かつ多量のエナメル芽細胞の再生が可能となる。今後、間葉系組織での Hippo 伝達経路の詳細な解析を行い、短期間かつ機能的な形態を有する歯の再生の臨床応用技術の開発を目指す。

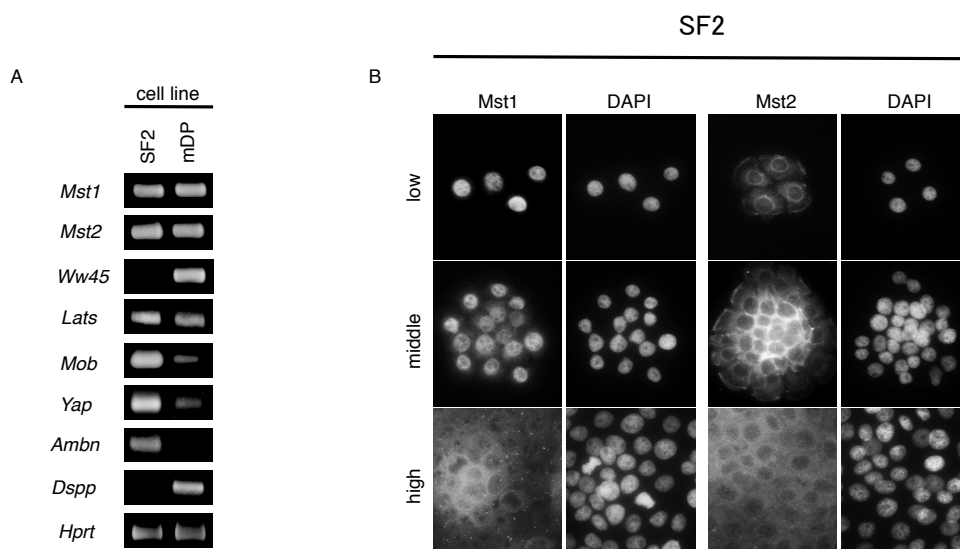
図および解説

図1 Hippo 伝達経路関連分子群の歯胚における mRNA 発現と Mst1/2 の局在



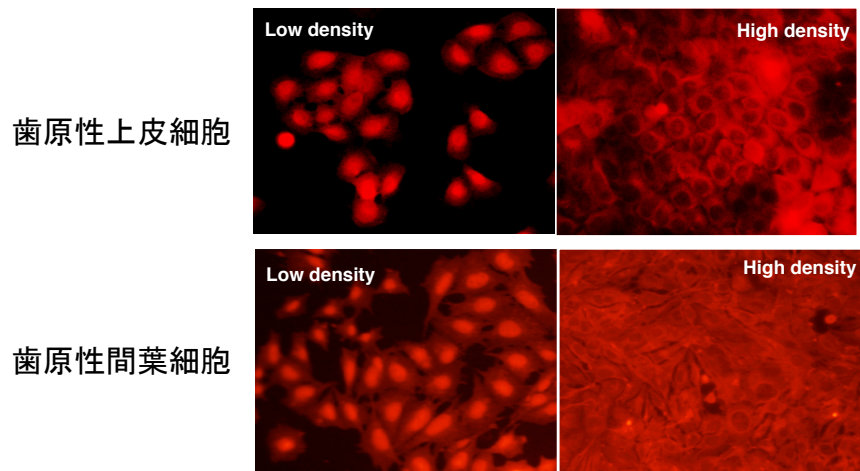
(A) 歯胚における Hippo 伝達経路関連分子群の発現解析を行なうために、マウス胎生 17.0 日齢 (E17.0) 歯胚より mRNA を抽出し RT-PCR 法により解析を行った。その結果、Hippo 伝達経路関連分子群である *Mst1*, *Mst2*, *Ww45*, *Lats*, *Mob*, *Yap* は、歯胚において発現を認めた。アメロブラスチン(*Ambn*)は歯原性上皮細胞のマーカーとして、象牙質シアロリン蛋白(*Dspp*)は歯原性間葉細胞のマーカーとして使用した。また、内部標準コントロールとして、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (*Hprt*) を用いた。(B) *Mst1* と *Mst2* の歯胚発生過程における発現局在を明らかにするために、マウス胎生 13.5 日齢 (E13.5), 14.5 日齢 (E14.5), 16.0 日齢 (E16.0) の歯胚切片を用いて免疫組織学的に検討した。その結果、蕾状期では *Mst1*, *Mst2* とともに頬側では上皮細胞, 間葉細胞に発現していることが確認されたが舌側ではエナメル上皮に発現を認めなかった。また、帽状期では *Mst1* は内エナメル上皮と外エナメル上皮で発現が認められなかったのに対し, *Mst2* はエナメル上皮と間葉細胞のいずれにおいても発現が認められた。さらに鐘状期においては *Mst1*, *Mst2* とともに上皮細胞, 間葉細胞に発現が認められた。

図 2 歯原性細胞における Hippo 伝達経路関連分子群発現と Mst1/2 の局在



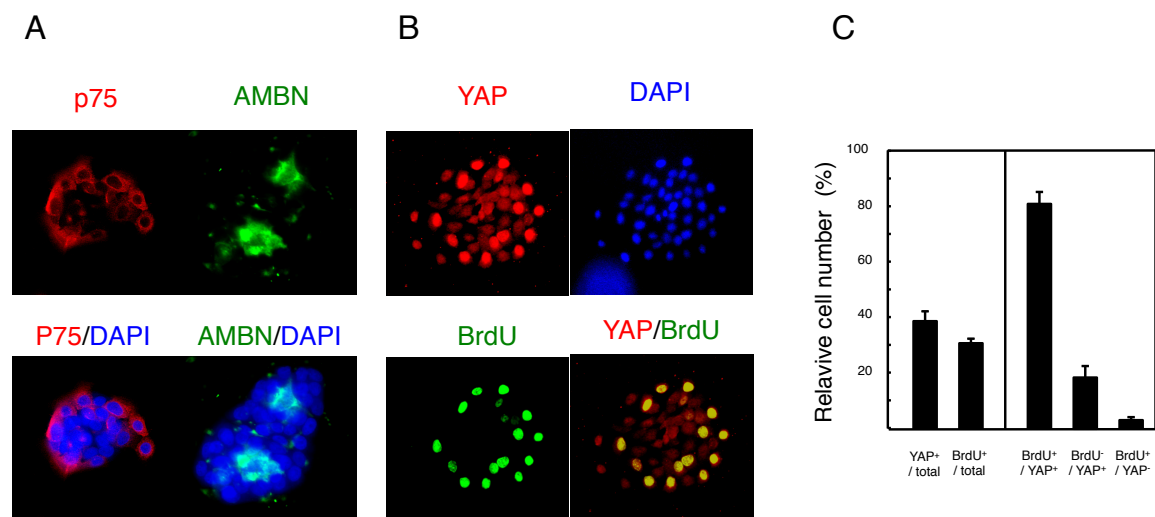
(A) ラット歯原性上皮細胞株 SF2, マウス歯乳頭由来間葉系細胞株 mDP における Hippo 伝達経路関連分子群の発現を解析するために, mRNA を抽出し RT-PCR 法により解析を行った。その結果, mDP 細胞では主な関連分子群の発現が認められたが, SF2 細胞では *Ww45* の発現が認められなかった。(B) SF2 細胞を用いて, 細胞密度と Mst1, Mst2 の発現局在との関係について, 免疫組織学的に検討した。その結果, Mst1 は細胞密度が低い状態では核内に発現する一方, 細胞密度が高くなると細胞質に局在していることが確認された。また, Mst2 は細胞密度に関わらず細胞質に局在していることが確認された。

図 3 歯源性細胞株における細胞密度と YAP の局在の変化



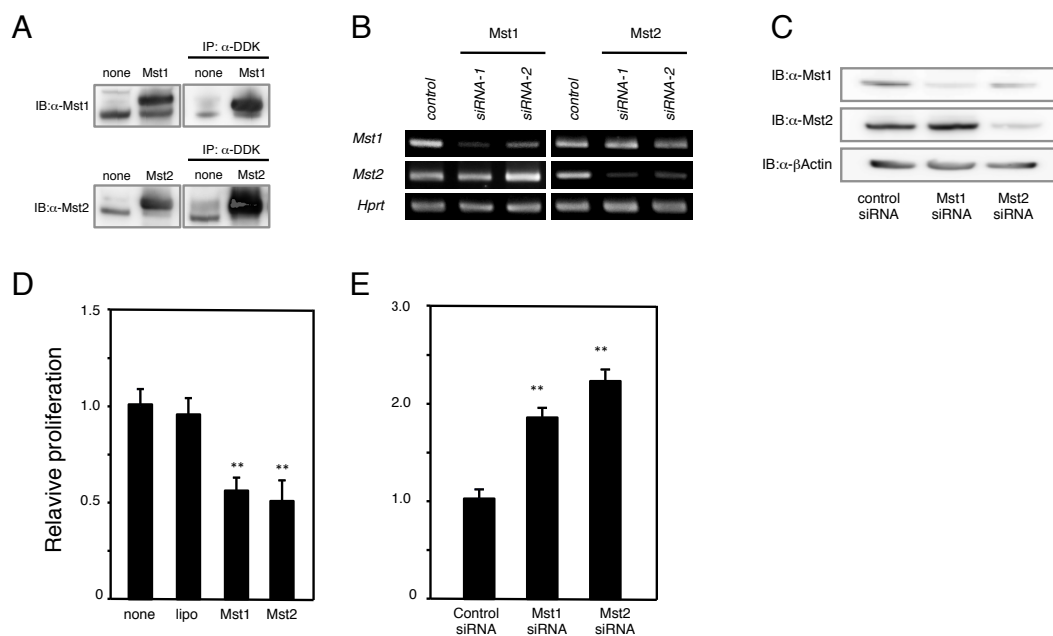
歯源性上皮細胞株 SF2 と歯源性間葉細胞株 mDP を用いて、細胞密度と YAP の発現局在との関係について、免疫組織学的に検討した。その結果、SF2 細胞と mDP 細胞のいずれにおいても、YAP は細胞密度が低い状態では核内に発現するが、細胞密度が高い状態では細胞質に局在していることが確認された。

図 4 歯原性上皮細胞株 SF2 における YAP 局在と細胞増殖と分化の関係



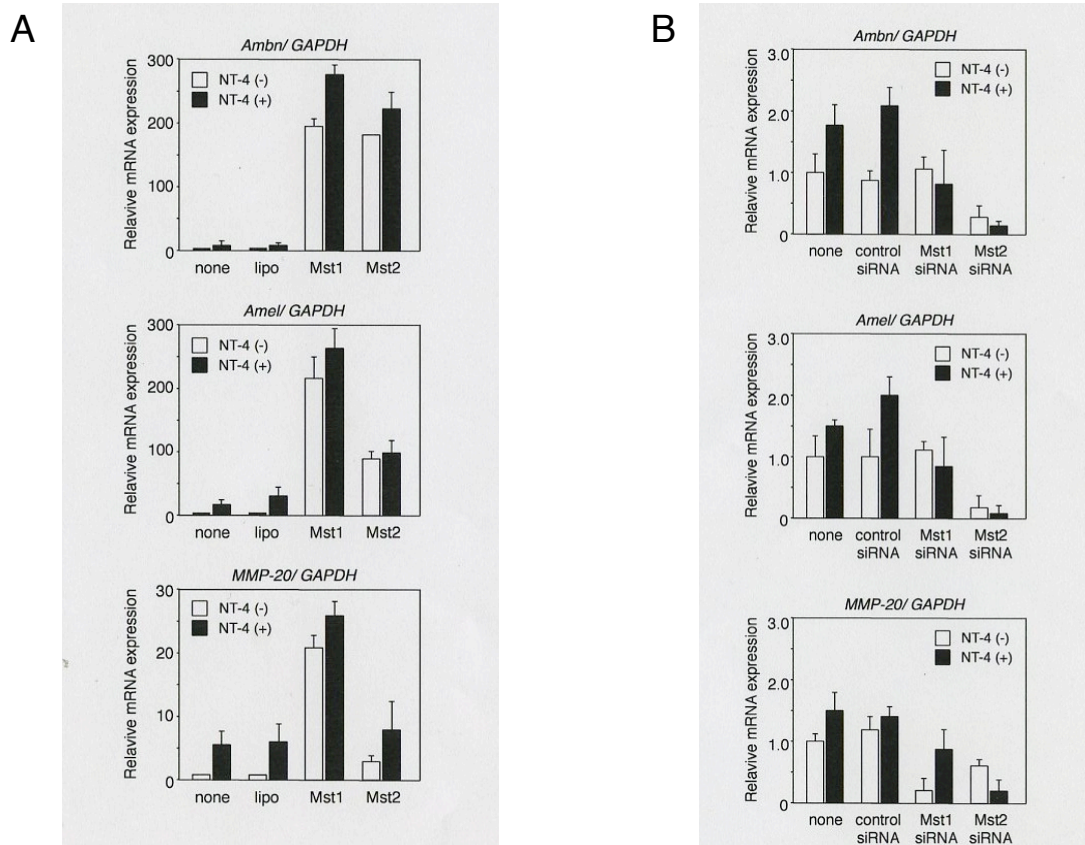
(A) 歯原性上皮細胞株 SF2 の細胞塊において細胞分化の勾配について免疫組織学的に検討した。その結果, SF2 細胞塊は細胞塊をとりまく外側の細胞では p75 が発現し, 細胞塊の中心周辺の細胞ではアメロブラスチン (Ambn) の発現が認められた。(B), (C) SF2 細胞の細胞増殖と YAP の関係を明らかにするために, SF2 細胞に BrdU を取り込ませ, 抗 BrdU 抗体と 抗 YAP 抗体で二重染色を行った。その結果, BrdU 陽性細胞と YAP 陽性細胞は高頻度で一致していることが明らかとなった。

図 5 Mst1/2 が歯原性上皮細胞株 SF2 の細胞増殖に与える影響



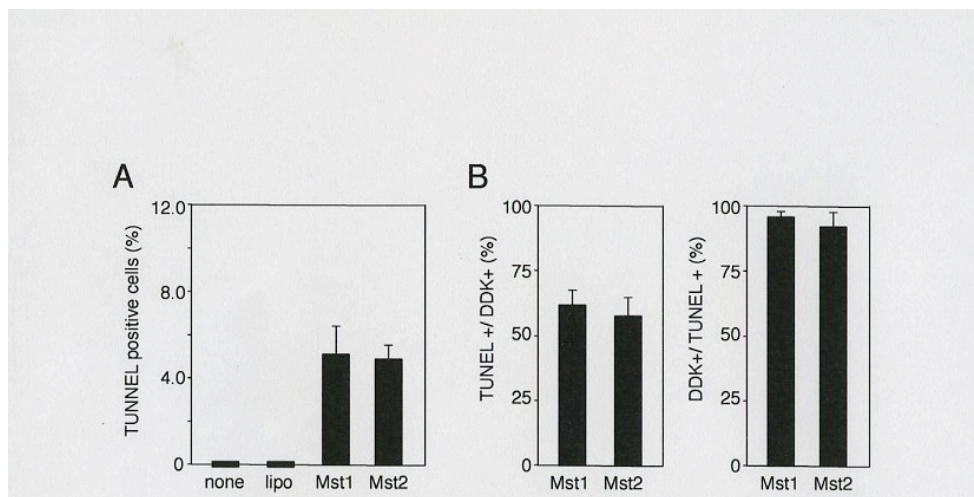
(A), (B), (C) 歯原性上皮細胞株 SF2 において YAP と細胞増殖が関連していたことから, YAP の上流因子である Mst1/2 について, その過剰発現と発現抑制が細胞増殖に及ぼす影響について解析するため, SF2 細胞に Mst1/2 発現ベクターと siRNA- Mst1/2 をそれぞれ遺伝子導入した。(D) Mst1/2 を過剰発現した細胞株においては細胞増殖が抑制された。(E) Mst1/2 を発現抑制した細胞株では細胞増殖の亢進が確認された。

図 6 Mst1/2 が歯原性上皮細胞株 SF2 の細胞分化に与える影響



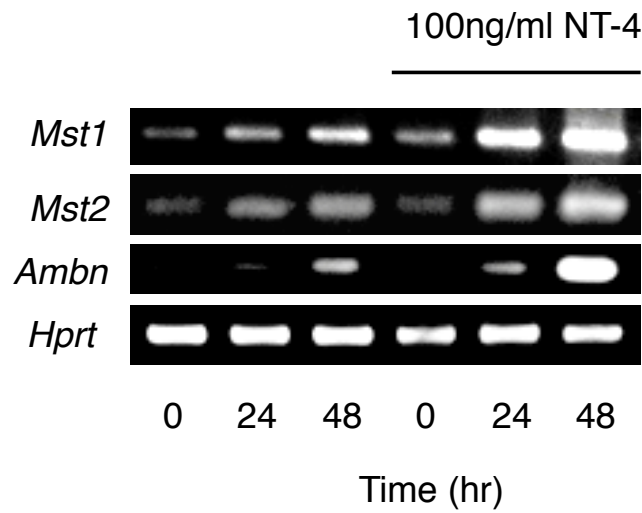
(A) Mst1/2の過剰発現と発現抑制が細胞分化に及ぼす影響について解析するために、Mst1/2発現ベクターとsiRNA-Mst1/2をそれぞれ遺伝子導入し、エナメル芽細胞分化誘導因子のひとつであるNT-4にて48時間刺激した。その後、mRNAを回収し、Real time RT-PCR法にて、エナメル芽細胞の分化マーカーであるアメロブラスチン (*Ambn*)、アメロゲニン (*Amel*) およびマトリックスメタロプロテアーゼ 20 (*Mmp20*) のmRNAの発現を比較検討した。その結果、Mst1/2を過剰発現した細胞株においては細胞分化の促進が認められた。(B) Mst1/2を発現抑制した細胞株では細胞分化の抑制が確認された。なお、相対遺伝子発現はGAPDHにより補正を行なった。

図 7 Mst1/2 が歯原性上皮細胞株 SF2 のアポトーシスに与える影響



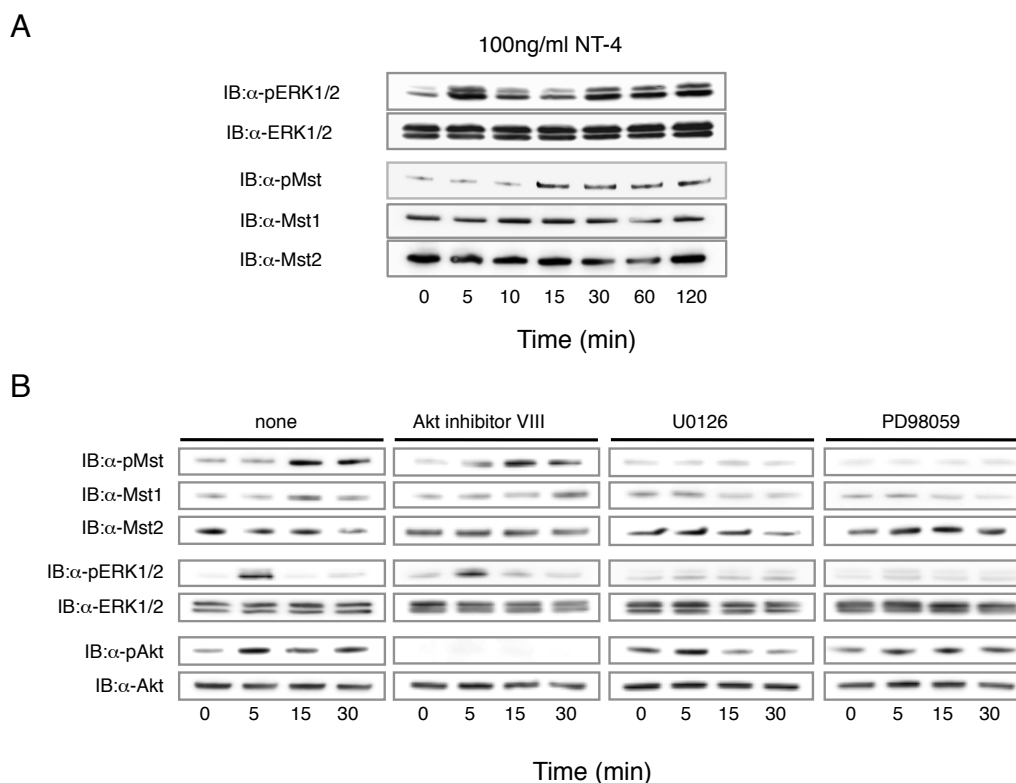
(A) Mst1/2 が歯原性上皮細胞においてアポトーシスに与える影響について解析するため, Mst1/2 過剰発現細胞株を用いて TUNEL 染色を行なった。その結果, 歯原性上皮細胞株において Mst1/2 を過剰発現させた細胞株では約 5% 程度の細胞がアポトーシスを起こしていることが確認された。(B) Mst1/2 を過剰発現させた SF2 細胞を TUNEL 染色後, 抗 DDK 抗体と二重染色を行なった。DDK 陽性細胞で TUNEL 染色陽性細胞の確率は約 60% 程度であったのに対し, TUNEL 陽性細胞で DDK 陽性細胞の確率は 90% を超えていることが確認された。

図 8 歯原性上皮細胞株 SF2 における NT-4 刺激による *Mst1/2* の発現促進



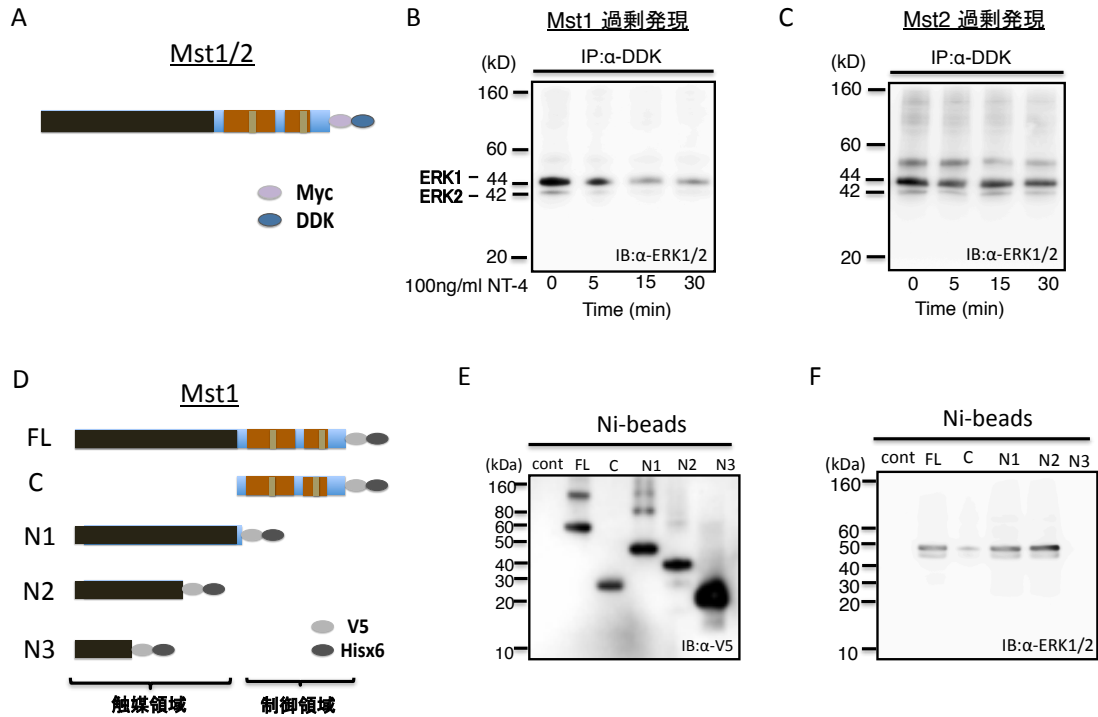
歯原性上皮細胞を 100ng/ml NT-4 にて 24, 48 時間刺激した。その後, mRNA を回収し RT-PCR 法により *Mst1* と *Mst2* の mRNA の発現解析を行なった。その結果, SF2 細胞において NT-4 刺激により, コントロールと比較して *Mst1*, *Mst2* の mRNA の発現促進が認められた。

図 9 歯原性上皮細胞株 SF2 における NT-4 刺激による Mst1/2 リン酸化



(A) 歯原性上皮細胞における NT-4 による細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、SF2 細胞を NT-4 で刺激した後、Mst1/2 と ERK1/2 のリン酸化をウエスタンブロットティング法にて検討した。その結果、Mst1/2 は NT-4 刺激 15 分後にリン酸化され、リン酸化はその後持続することが確認された。また、ERK は NT-4 刺激後 5 分と 30 以降にリン酸化されることが確認された。(B) ERK1/2 と Mst1/2 のシグナルにおける関係について解析するために、Akt 阻害剤と MEK 阻害剤で処理した歯原性上皮細胞株を NT-4 により刺激した際の Mst1/2 のリン酸化について解析を行なった。その結果、Akt 阻害剤で処理した SF2 細胞株はコントロール同様に Mst1/2 がリン酸化されたのに対し、MEK 阻害剤で処理した細胞株は Mst1/2 のリン酸化が認められなかった。

図 10 歯原性上皮細胞株 SF2 における NT-4 刺激での ERK1 と Mst1 の結合



(A) (B) , (C) ERK1/2 と Mst1/2 の結合について解析するため、SF2 細胞に Mst1, Mst2 を過剰発現させ NT-4 で刺激後、DDK 抗原により免疫沈降を行い、抗 ERK1/2 抗体によるウエスタンブロッティング法にて検討した。その結果、Mst1 過剰発現細胞において NT-4 刺激後の ERK1 と Mst1 との直接の結合が確認された。

(D) , (E) , (F) ERK1 の Mst1 に対する結合部位について解析する為に、リコンビナントタンパク発現ベクターを作成し、SF2 細胞に導入し 48 時間培養しタンパクを回収した後ニッケルビーズによる免疫沈降を行い、抗 ERK1/2 抗体によるウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、ERK1 は Mst1 の N 末端側に存在する触媒領域に結合していることが確認された。

表 1 RT-PCR に用いたプライマー

Gene name	Forward primer	Reverse primer	Size(bp)	Annealing temp (°C)
Ambn (mouse/rat)	5'-GCGTTTCCAAGAGCCCTGATAAC-3'	5'-AAGAAGCAGTGTCACATTTCTGG-3'	366/368	60
Mst1 (mouse)	5'-TCATTGGCTACGGAACAAGAC-3'	5'-GGGCTTTTACCAGACTGCTTC-3'	459	60
Mst2 (mouse)	5'-GCTTGGAGAAGGGTCTTATGGAAG-3'	5'-GATGTGAGCCACACAGTTGTAACCC-3'	517	60
Ww45(mouse)	5'-TGACCATGTGTCCAGCCTTA-3'	5'-CGAATGGATGCTGCATATTG-3'	902	60
Lats (mouse)	5'-GACGATGTTTCCAAGTGTGCTGTG-3'	5'-CAACCAGCATCTCAAAGAGAATCACAC-3'	199	60
Mob (rat)	5'-GTTCCGATACCCCTAAAACCAAG-3'	5'-GCAACAAAGTCCAGAGAGCAGAATC-3'	441	60
Mob (mouse)	5'-TGGTCTGTTTCACTTTGGATAG-3'	5'-GGCAAGGAGGATGGAAGCATT-3'	767	60
Yap(rat)	5'-GGAATTCTATGGAGCCCGCAA-3'	5'-ACGCGTCGACCTATAACCACGTGAG-3'	175	55
Yap(mouse)	5'-TCTGCGCAGCCAGTTGCCTA-3'	5'-GCTCATGCTGAGCCGCTGT-3'	175	55
Dspp (mouse)	5'-CTCAGAGAGAATCTGGGTGTACCACC-3'	5'-CACAGTGGTACATGGAGAGCTC-3'	633	60
Hprt (mouse)	5'-GCGTCGTGATTAGCGATGATGA-3'	5'-GTCAAGGGCATATCCAACAACA-3'	563	55

表 2 Real time PCR に用いたプライマー

Gene name	Forward primer	Reverse primer	Size(bp)	Annealing temp (°C)
Ambn (rat)	5'-TTGAATGCTCCTGCCAGAATCG-3'	5'-TAAGGGTTTGCCTGAAGCCTCC-3'	118	60
Amel (rat)	5'-GATGGCTGCACCACCAATC-3'	5'-CTGAAGGGTGTGACTCGGG-3'	65	60
Enam (rat)	5'-ACCGAAAGTCCTGACACATTGG-3'	5'-CCTGAAGCAGTAAACAGCCGTG-3'	154	60
MMP-20 (rat)	5'-GGCGAGATGGTGGCAAGAG-3'	5'-CTGGGAAGAGCGGTAGTT-3'	166	60
Gapdh (rat)	5'-GGAGCGAGACCCCACTAACATC-3'	5'-CTCGTGGTTCACACCCATCAC-3'	181	60

表3 Mst1/2 抑制に用いた siRNA シークエンス

Gene name	Sequences
Mst1 siRNA-1	5'-UAAUUAAGUCUCGCAGUAUGGCCGC-3'
Mst1 siRNA-2	5'-UUUCAUCCUCCUCUGAGUUCUMCAUC-3'
Mst2 siRNA-1	5'-AAUUAUGUCUGAAACGGACCCGGCC-3'
Mst2 siRNA-2	5'-UUCUGAACUAGUCUUCACCAUAGUG-3'

表4 リコンビナントタンパク発現ベクター作製時用いたプライマー

Primer number	sequence
F1	atg gag acc gtg cag ctg ag
F2	atg gtt cga gct gcc ggt gat gag
R1	ttc tcc tcc gtt gtc ttg aag
R2	cgt gcc gga atc cat ttc atc ctc
R3	t cgg tga gtc gag gat gtc
R4	taa gcc gat gcc ttg ttc tgc

表5 リコンビナントタンパク発現ベクター作製時に合成した cDNA

Primer number	Product size (bp)	annealing temp (°C)
FL	1461	60.0
C	471	57.0
N1	990	58.5
N2	831	60.0
N3	360	55.0

参考文献

- 1) Hippo signaling in organ size control.
Pan D.
Genes Dev. 2007 Apr 15;21(8):886-97.
- 2) Regulation of Organ Size: Insights From the Drosophila Hippo Signaling Pathway
Kango-Singh M, Singh A.
Dev Dyn. 2009 Jul;238(7):1627-37.
- 3) Biosignaling of mammalian Ste20-related kinases.
Ling P, Lu TJ, Yuan CJ, Lai MD.
Cell Signal. 2008 Jul;20(7):1237-47.
- 4) Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene.
Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, Lauwers GY, Thasler W, Lee JT, Avruch J, Bardeesy N.
Cancer Cell. 2009 Nov 6;16(5):425-38.
- 4) Mst1 overexpression inhibited the growth of human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo.
Xu CM, Liu WW, Liu CJ, Wen C, Lu HF, Wan FS.
Cancer Gene Ther. 2013 Aug;20(8):453-60.
- 5) Clinicopathologic characteristics of YES-associated protein 1 overexpression and its relationship to tumor biomarkers in gastric cancer.
Zhang J, Yang YC, Zhu JS, Zhou Z, Chen WX.
Int J Immunopathol Pharmacol. 2012 Oct-Dec;25(4):977-87.

- 7) LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker.
Chen D, Sun Y, Wei Y, Zhang P, Rezaeian AH, Teruya-Feldstein J, Gupta S, Liang H, Lin HK, Hung MC, Ma L.
Nat Med. 2012 Oct;18(10):1511-7.
- 8) Wnt/ β -catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells.
Konsavage WM Jr, Kyler SL, Rennoll SA, Jin G, Yochum GS.
J Biol Chem. 2012 Apr 6;287(15):11730-9.
- 9) Identification of a tumor suppressor relay between the FOXP3 and the Hippo pathways in breast and prostate cancers.
Li W, Wang L, Katoh H, Liu R, Zheng P, Liu Y.
Cancer Res. 2011 Mar 15;71(6):2162-71.
- 10) Phosphorylation of the tumor suppressor fat is regulated by its ligand Dachshund and the kinase discs overgrown.
Sopko R, Silva E, Clayton L, Gardano L, Barrios-Rodiles M, Wrana J, Varelas X, Arbouzova NI, Shaw S, Saburi S, Matakatsu H, Blair S, McNeill H.
Curr Biol. 2009 Jul 14;19(13):1112-7.
- 11) Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded.
Yu J, Zheng Y, Dong J, Klusza S, Deng WM, Pan D.
Dev Cell. 2010 Feb 16;18(2):288-99.
- 10) Wnt/ β -catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells.
Konsavage WM Jr, Kyler SL, Rennoll SA, Jin G, Yochum GS.
J Biol Chem. 2012 Apr 6;287(15):11730-9.

- 11) Identification of a tumor suppressor relay between the FOXP3 and the Hippo pathways in breast and prostate cancers.
Li W, Wang L, Katoh H, Liu R, Zheng P, Liu Y.
Cancer Res. 2011 Mar 15;71(6):2162-71.
- 12) A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β -catenin signalling.
Imajo M, Miyatake K, Iimura A, Miyamoto A, Nishida E.
EMBO J. 2012 Mar 7;31(5):1109-22
- 13) Yes-associated protein up-regulates Jagged-1 and activates the Notch pathway in human hepatocellular carcinoma.
Tschaharganeh DF, Chen X, Latzko P, Malz M, Gaida MM, Felix K, Ladu S, Singer S, Pinna F, Gretz N, Sticht C, Tomasi ML, Delogu S, Evert M, Fan B, Ribback S, Jiang L, Brozzetti S, Bergmann F, Dombrowski F, Schirmacher P, Calvisi DF, Breuhahn K.
Gastroenterology. 2013 Jun;144(7):1530-1542. e12.
- 14) YAP regulates neuronal differentiation through Sonic hedgehog signaling pathway.
Lin YT, Ding JY, Li MY, Yeh TS, Wang TW, Yu JY.
Exp Cell Res. 2012 Sep 10;318(15):1877-88
- 15) Dmp53 activates the Hippo pathway to promote cell death in response to DNA damage.
Colombani J, Polesello C, Josu e F, Tapon N.
Curr Biol. 2006 Jul 25;16(14):1453-8.
- 16) The growth regulators warts/lats and melted interact in a bistable loop to specify opposite fates in Drosophila R8 photoreceptors.
Mikeladze-Dvali T, Wernet MF, Pistillo D, Mazzoni EO, Teleman AA, Chen YW, Cohen S, Desplan C.
Cell. 2005 Sep 9;122(5):775-87.

- 17) Regulation of cell shape, wing hair initiation and the actin cytoskeleton by Trc/Fry and Wts/Mats complexes.
Fang X, Adler PN.
Dev Biol. 2010 May 15;341(2):360-74
- 18) The tumour suppressor Hippo acts with the NDR kinases in dendritic tiling and maintenance.
Emoto K, Parrish JZ, Jan LY, Jan YN.
Nature. 2006 Sep 14;443(7108):210-3.
- 19) The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation.
Lian I, Kim J, Okazawa H, Zhao J, Zhao B, Yu J, Chinnaiyan A, Israel MA, Goldstein LS, Abujarour R, Ding S, Guan KL.
Genes Dev. 2010 Jun 1;24(11):1106-18.
- 20) Activation of Mst1 causes dilated cardiomyopathy by stimulating apoptosis without compensatory ventricular myocyte hypertrophy.
Yamamoto S, Yang G, Zablocki D, Liu J, Hong C, Kim SJ, Soler S, Odashima M, Thaisz J, Yehia G, Molina CA, Yatani A, Vatner DE, Vatner SF, Sadoshima J.
J Clin Invest. 2003 May;111(10):1463-74.
- 21) PDGFs regulate tooth germ proliferation and ameloblast differentiation
Wu N, Iwamoto T, Sugawara Y, Futaki M, Yoshizaki K, Yamamoto S, Yamada A, Nakamura T, Nonaka K, Fukumoto S.
Arch Oral Biol. 2010 Jun;55(6):426-34.
- 22) Neurotrophic Factor Neurotrophin-4 Regulates Ameloblastin Expression via Full-length TrkB
Yoshizaki K, Yamamoto S, Yamada A, Yuasa K, Iwamoto T, Fukumoto E, Harada H, Saito M, Nakasima A, Nonaka K, Yamada Y, Fukumoto S.

- J Biol Chem. 2008 Feb 8;283(6):3385-91.
- 23) The *Drosophila* Mst Ortholog, *hippo*, Restricts Growth and Cell Proliferation and Promotes Apoptosis
Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK.
Cell. 2003 Aug 22;114(4):457-67.
- 24) The N-terminal RASSF family: a new group of Ras-association-domain-containing proteins, with emerging links to cancer formation.
Sherwood V, Recino A, Jeffries A, Ward A, Chalmers AD.
Biochem J. 2009 Dec 23;425(2):303-11.
- 25) Phosphorylation and Dimerization Regulate Nucleocytoplasmic Shuttling of Mammalian STE20-like Kinase (MST)
Lee KK, Yonehara S.
J Biol Chem. 2002 Apr 5;277(14):12351-8.
- 26) TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control.
Bin Zhao, Xin Ye, Jindan Yu, Li Li, Weiquan Li, Siming Li, Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, Lai ZC, Guan KL.
Genes Dev. 2008 Jul 15;22(14):1962-71.
- 27) Structural and functional insights into the TEAD-YAP complex in the Hippo signaling pathway
Chen L, Loh PG, Song H.
Protein Cell. 2010 Dec;1(12):1073-83.
- 28) Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3.
Knüsel B, Winslow JW, Rosenthal A, Burton LE, Seid DP, Nikolics K,

- Hefti F.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Feb 1;88(3):961-5.
- 29) Promotion of the development of enteric neurons and glia by neuropoietic cytokines: interactions with neurotrophin-3.
Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J, Vinson EN, MacLennan AJ, Gershon MD.
Dev Biol. 1998 Jun 15;198(2):343-65.
- 30) The effects of neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor on cerebellar granule cell movement and neurite extension in vitro.
Tanaka S, Sekino Y, Shirao T.
Neuroscience. 2000;97(4):727-34.
- 31) Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models.
Johnson EC, Guo Y, Cepurna WO, Morrison JC.
Exp Eye Res. 2009 Apr;88(4):808-15.
- 32) Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung.
Ricci A, Felici L, Mariotta S, Mannino F, Schmid G, Terzano C, Cardillo G, Amenta F, Bronzetti E..
Am J Respir Cell Mol Biol. 2004 Jan;30(1):12-9.
- 33) TrkB is necessary for the normal development of the lung.
Garcia-Suarez O, Pérez-Pinera P, Laurà R, Germana A, Esteban I, Cabo R, Silos-Santiago I, Cobo JL, Vega JA.
Respir Physiol Neurobiol. 2009 Jul 31;167(3):281-91
- 34) Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in

- epithelial ovarian cancer.
Campos X, Muñoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L,
Weinstein-Oppenheimer C, Lara HE, Romero C.
Gynecol Oncol. 2007 Jan;104(1):168-75.
- 35) Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation. Activation and autophosphorylation.
Glantschnig H, Rodan GA, Reszka AA.
J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):42987-96.
- 36) The Role of p38 MAPK and Its Substrates in Neuronal Plasticity and Neurodegenerative Disease.
Corrêa SA, Eales KL.
J Signal Transduct. 2012;2012:649079.
- 37) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins.
Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR.
Cell. 1994 Sep 23;78(6):1027-37.
- 38) The development of a bioengineered organ germ method.
Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T.
Nat Methods. 2007 Mar;4(3):227-30. Epub 2007 Feb 18.
- 39) Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation.
Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, Fukumoto S.
J Biol Chem. 2012 Mar 23;287(13):10590-601.

40) Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells Into Dental
Mesenchymal Cells

Otsu K, Kishigami R, Oikawa-Sasaki A, Fukumoto S, Yamada A,
Fujiwara N, Ishizeki K, Harada H.

Stem Cells Dev. 2012 May 1;21(7):1156-64.

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました本学口腔保健発育学講座小児発達歯科学分野 福本敏教授，徳島大学大学院社会環境衛生学講座小児歯科学分野 岩本勉教授（前東北大学病院小児歯科講師）に深甚なる謝意を表します。

また，終始ご助力いただきました小児発達歯科学分野の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。