

4. 考察

4-1. 胎仔期、生後および成体マウスの歯周組織細胞における SIX1 の発現様式の変化

本研究での重要なポイントは、生後および成体マウスの歯周組織においても SIX1 が発現することを見出したことである (図 3)。生後マウスを経時的に解析すると、歯根膜形成期の PN14 までは歯根膜領域全体で SIX1 が豊富に発現するが、歯根膜の形成を終えた PN28 以降では、SIX1 の発現細胞数とその発現レベルの両者ともに減少する (図 3)。また、PN14 の歯根膜では、増殖性細胞と SIX1 陽性細胞が歯根膜全体で数多く観察され、EdU と SIX1 の共陽性細胞は EdU 陽性細胞の約半数である。PN28 の歯根膜では、EdU 陽性細胞数と SIX1 陽性細胞数ともに大幅に減少するものの、EdU と SIX1 の共陽性細胞は EdU 陽性細胞の半数弱である (図 5)。これらの観察から、SIX1 は歯根膜細胞の増殖や分化に極めて重要な役割を担っていると考えられる。

歯の形成は、上皮組織より分泌される FGF-8 と BMP-4 および SHH 等のシグナル分子が、第一鰓弓に侵入した神経堤由来外胚葉性間葉組織に作用し、開始される。外胚葉性間葉組織では *Msx1* や *Pax9* が誘導される。そして、間葉細胞は細胞接着因子である SYNDECAN-1 や TENASCIN を分泌しながら、増殖と凝集をはじめめる。さらに間葉組織で誘導された BMP-4 は、肥厚した上皮に作用して *Msx2*、*p21*、*Lef1* などの発現を誘導する。帽状期 (cap stage) となり、エナメル結節が現れると、再び上皮で BMP-2, BMP-4 と FGF-4, FGF-9 が産生されてエナメル器が発達する (Peter et al., 1999; 須田立雄, 2007) (図 17)。このように歯や歯周組織は、上皮と間葉を液性シグナルが行き交う上皮間葉相互作用を通じて形成される。

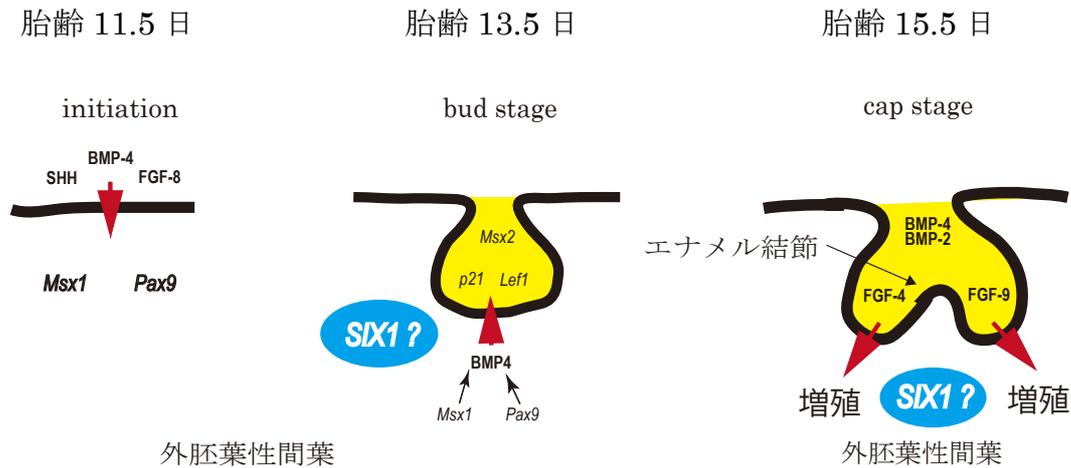


図 17. 歯形成領域における上皮間葉相互作用の模式図

私が所属する研究室の高橋らは、以前に、*Six1* が胎仔期マウスの歯小囊において発現することを報告した (Nonomura et al., 2010)。また、図 3 で示した、bell stage よりさらに早い時期の bud stage や cap stage に相当する段階の歯胚においても、*SIX1* の発現を確認した (図 18)。*Six1* は耳胞のパターン形成を特徴づける複数の遺伝子群の発現調節に関わり、内耳の発生に極めて重要な役割をもつ (Ozaki et al., 2004)。*Six1*^{-/-} では内耳が形成されず、耳胞における *Bmp-4* の発現が消失する (Ozaki et al., 2004)。一方、*BMP-4* は歯胚形成における上皮間葉相互作用において重要なシグナル分子である (図 17)。したがって、これらのことを考慮すると、初期歯胚形成においては、*Six1* は *Bmp-4* 発現を制御し、初期歯胚発達の上皮間葉相互作用に関与することが示唆される。

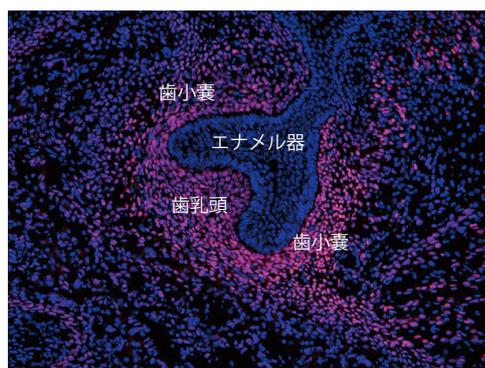


図 18. cap stage の歯胚における SIX1 タンパク質の発現様式

赤は SIX1、青は DAPI を示す。SIX1 は、エナメル器を取り囲む歯乳頭および歯小囊細胞に強く発現する。

4-2. ヒト培養歯根膜細胞における SIX1 の発現とその性質

ヒト歯根膜由来細胞における SIX1 の発現は、ほぼ全ての細胞に認められた(図 8)。遊走法で得られたヒト歯髓由来細胞、ヒト歯小囊細胞および歯根膜細胞にも SIX1 の発現が認められた(未発表データ)。遊走法は得られた組織片を培地の中に静置し、組織片から遊走性の高い細胞が這い出すのを待つ方法である。本研究では歯根膜幹細胞研究分野で一般的な単離採取方法である、酵素法を用いて調製した歯根膜由来細胞を使用し、実験系を統一した。歯根膜幹細胞の特異的マーカータンパク質は現在のところ同定されていないものの、CD146 および STRO-1 が用いられることが多い(Seo et al., 2004)。遊走法と酵素法で単離される細胞の性質の違いは、CD146 陽性細胞が含まれるかどうかであり、実際に遊走法により調製した細胞では CD146 の発現をほとんど認めなかった(未発表データ)。また、STRO-1 マーカータンパク質について、蛍光免疫染色を行ったところ、バックグラウンドが強く、明らかな発現を確認出来なかった(未発表データ)。培養歯根膜細胞は様々なマーカータンパク質を発現するヘテ

ロな細胞集団であり、非常に高い増殖能を示すことが知られている。歯根膜細胞を特徴づけるマーカータンパク質の TNMD は、他の論文での報告と一致して、継代数 3 (P3) あるいは P4 で、SIX1 と同時に発現が見られる細胞が数多く観察された (図 8A および未発表データ)。

本研究では、生後マウスの生体歯根膜における SIX1 の発現を報告したが、ヒトの生体歯根膜における SIX1 の発現は観察していない。従って、ヒト培養歯根膜細胞での SIX1 の発現が、元来の生体歯根膜での発現を引き継いでいるものなのか、初代培養の過程であらためて発現してきたものなのかは評価出来ない。しかしながら、マウス生体における SIX1 の発現は、発生過程では認められるものの、器官の成熟とともに発現が低下すること (Ford et al., 1998)、感覚器やその他器官形成においては、細胞増殖を盛んに行う前駆細胞集団に *Six1* が必須であること (Zheng et al., 2003; Li et al., 2003; Ozaki et al., 2004; Ikeda et al., 2007; Sato et al., 2010; Suzuki et al., 2010; Ikeda et al., 2010; Suzuki et al., 2011)、そして、マウスの筋肉の成長や再生に関与する筋芽細胞あるいは筋衛星細胞にも SIX1 の発現を認める (Yajima et al., 2010; Le Grand et al., 2012) ことから、ヒト生体歯根膜においても、歯根膜の成熟に伴い一旦は SIX1 の発現が低下するものの、歯根膜細胞が単離培養され、活発に増殖することで、SIX1 が再発現したと考える。

4-3. *SIX1* による歯根膜細胞の増殖制御

Six1^{-/-}と野生型の E18.5 の歯小囊における増殖性細胞数の割合を比較したところ、*Six1*^{-/-} は野生型と比較して 21%減少していた (図 7)。また、*SIX1* をノックダウンしたヒト培養歯根膜細胞では、コントロールと比較して増殖性細胞数の割合が 28%減少した (図 16)。細胞増殖性に関連した *SIX1* の機能として、ある種のがん細胞に

においては、*SIX1* の発現が亢進しており、さらに *SIX1* が細胞増殖 G1 期から S 期への移行促進に関わる *cyclin D1* や *cyclin A1* (Harper et al., 1993) の発現を直接調節することで細胞増殖を促進することが知られている (Coletta et al., 2004; Li et al., 2013; Wu et al., 2015)。また、*Six1*^{-/-} 顎下腺では *cyclin A1* の発現が低下して、顎下腺組織の低形成をもたらすこと、及び、野生型マウス顎下腺では E18.5 において強く発現していた *Six1* と *cyclin A1* が、PN28 までに両方とも著しく減少するとの報告がある (McCoy et al., 2009b)。これらのことは、がん細胞における *Six1/SIX1* 発現と正常発生における *Six1/SIX1* 発現が *cyclin D1* や *cyclin A1* を介して、細胞増殖の制御に関与することを示唆する。ヒト培養歯根膜細胞における *SIX1* のノックダウンにより、*cyclin* 依存性キナーゼ阻害タンパク質である、p21 と p27 がコントロールと比較して増加した (未発表データ) ことから、*SIX1* と細胞周期阻害タンパク質の関与も考えられる。歯小囊や培養歯根膜細胞においても、*SIX1* が *cyclin D1* や *cyclin A1* を介して細胞周期制御することで、増殖を制御している可能性が示唆される。

4-4. 石灰化抑制因子としての *SIX1* の可能性

骨芽細胞へと分化誘導した培養歯根膜細胞は、後期骨芽細胞マーカーの Osteocalcin (OCN) を発現したが、石灰化物の形成までは認められなかった。また、骨分化誘導後の培養歯根膜細胞には *SIX1* の発現が引き続き認められた (図 11)。OCN は後期骨分化マーカータンパク質であるものの、OCN 欠損マウスでは、骨組織の石灰化には全く異常が認められず、野生型と比べ、骨形成が亢進することから、OCN はむしろ石灰化に抑制的に作用すると考えられている (須田立雄, 2007)。マウス歯根膜で、歯根の表層に位置する CB (セメント芽細胞) は *SIX1* の発現が見られないことから (図 3C3, 4*)、歯根象牙質の表層のセメント質以外の歯根膜では *SIX1* の発現

によって石灰化が抑制されている可能性がある。そして骨芽細胞分化誘導においても、*SIX1* が *OCN* の発現を維持することによって石灰化の抑制を行っている可能性がある。分化誘導前の培養歯根膜細胞において *OCN* 発現細胞は多く観察された（未発表データ）。培養歯根膜細胞での *OCN* の発現は *RUNX2* の発現と同様に歯根膜細胞の特徴であると考えられている（Lindroos et al., 2008; Itaya et al., 2009; Ozer et al., 2013）。また、軟骨分化マーカータンパク質である *Aggrecan* 陽性細胞がわずかに存在し、脂肪細胞マーカータンパク質である *FABP4* 陽性細胞は、全く観察されなかった（未発表データ）。*SIX1* が *OCN* の発現を維持しているのかどうか、そして石灰化の抑制に働いているのかどうかを明らかにするためには、*siRNA* 等による *SIX1* の機能阻害をした条件で、骨分化誘導実験を行う必要がある。さらに同条件下において、未分化性マーカータンパク質の発現や、骨芽細胞、脂肪細胞、さらには、軟骨細胞を特徴づける各種マーカータンパク質の発現の誘導などの変化が見られるかどうかを確認する必要がある。本実験系で真に骨分化が行われて、硬組織形成能を有するか否かを明確にするためには、細胞へのカルシウムの蓄積を示す、アリザリンレッド S 染色や Von kossa 染色を用いる必要がある。今後は *SIX1* 機能阻害が歯根膜細胞の分化に及ぼす影響を詳細に解析し、*SIX1* の分化制御機能解明につなげたい。

4-5. 歯周組織形成における *Six* ファミリー 遺伝子の機能的重複の可能性

Six1^{-/-} においては、内耳、嗅上皮、味蕾、腎臓、筋肉、神経節および顎下腺などの器官形成の欠陥が報告されている（Zheng et al., 2003; Li et al., 2003; Ozaki et al., 2004; Konishi et al., 2006; Ikeda et al., 2007; McCoy et al., 2009b; Suzuki et al., 2010; Ikeda et al., 2010; Suzuki et al., 2011）ものの、歯の形成については何ら報告がない。野生型と *Six1*^{-/-} の E18.5 の歯小嚢を含む歯胚の比較を行ったが、形態や大

きさにはっきりとした差異は認められなかった (図 7)。 *Six1/Six4* 欠損ホモマウスの器官形成の欠陥は *Six1* 欠損ホモマウスよりも甚大であることから (Grifone et al., 2005; Konishi et al., 2006; Giordani et al., 2007; Kobayashi et al., 2007)、 *Six1* 欠損ホモマウス歯胚でも他の *Six* ファミリー遺伝子による機能相補が行われている可能性が考えられる。胎仔期マウスの歯胚には *Six1* の他に *Six2*, *Six4*, *Six5* の発現が確認されている (Nonomura et al., 2010) ことから、マウス歯胚においては他の *Six* ファミリー遺伝子による *Six1* の機能相補が生じていることは十分に考えられる。本実験で使用した培養歯根膜細胞には *SIX4* の発現を認めた (未発表データ)。 *SIX1* の機能をより深く理解するために、 *SIX1* 単独での機能阻害解析に加え、 *Six1/Six2* あるいは *Six1/Six5* 欠損ホモマウスでの歯小囊の形態的变化、ならびに *SIX1/SIX4* 機能阻害による培養歯根膜細胞への影響、について研究を掘り下げる必要があると考える。また、本研究では *Six1*^{-/-} が生後すぐに死亡するため、出生直前の E18.5 における *Six1* 解析を行っている。出生後の歯冠や歯根の形成過程は、マウスやラットの腎皮膜下移植等の方法により観察しうる (Sakuraba et al., 2012)。今後、野生型および *Six1*^{-/-} から歯胚を摘出して腎皮膜下へ移植することにより、 *SIX1* 欠損が歯冠や歯根の形態形成にどのように影響するのか経時的な追跡実験を行いたいと考えている。

4-6. 今後の展望

本研究は、 *SIX1* が歯の発生段階において、歯根膜前駆細胞や歯根膜幹細胞の増殖を担っていることを示した。そして研究を通して、 *Six1*^{-/-} を用いた生体内における *Six1* の機能解析方法と siRNA を用いた培養細胞に対する機能阻害実験系を確立する事ができた。歯根膜細胞は線維芽細胞様でありながら、腱・靭帯関連マーカーや骨芽細胞マーカーを発現するなどのユニークな特徴を持っている。したがって、今後は従

来の歯周組織再生ツールとしてのみならず、口腔内に限らない他の組織への応用を見据えた研究を行うべきであると考えている。具体的には手足の腱・靭帯・および関節軟骨の再生研究である。口腔は、組織、器官の中で最も外界と交通している器官の1つであるため、組織や細胞の採取が容易であるという利点がある。しかも、利用する細胞ソースが医療廃棄物として扱われている抜去歯牙であるため、身体への侵襲はかなり低く、倫理面での問題も生じにくい。幹細胞研究分野で、臨床応用の基盤となる情報を歯科が中心となり提供することが可能である。もう1つの展開としては、がん研究ツールとして *SIX1* を用いる研究を考える。がんの悪性度を測る指標として、腫瘍での *SIX1* の発現レベルが注目されている。さらに、がんの転移を引き起こす上皮間葉転換にも *SIX1* の関与が報告されている (McCoy et al., 2009a)。したがって、我々歯科・口腔外科医が扱う、口腔扁平上皮がんや唾液腺がんの頸部リンパ節転移と *SIX1* の関係は今後研究すべき重要な課題である。本研究は発生とステムネス（幹細胞性）という観点からのアプローチとなったが、組織幹細胞はがん幹細胞とも密接に関わるため、今後これらの研究に取り組み歯科臨床に関係する研究活動を是非続けたい。

5. 総括

本研究では、マウス歯根膜発生時における *Six1* およびヒト培養歯根膜細胞における *SIX1* の役割を明らかにすることを目的として、1) 生後マウスの歯小囊および歯根膜における *SIX1* の発現分布解析を行った。2) *SIX1* 発現細胞と EdU 標識される増殖性細胞の数を生後 14 日齢 (PN14) マウスと生後 28 日齢 (PN28) マウスで比較した。3) 胎齢 18.5 日 (E18.5) 野生型マウスと *Six1* 欠損ホモマウスの歯小囊において EdU 標識される増殖性細胞数の割合を比較した。4) ヒト培養歯根膜細胞が *SIX1* を発現するのか、歯根膜幹細胞を含むか否かを検討した。5) ヒト培養歯根膜細胞を用いた *SIX1* siRNA によるノックダウン実験により、増殖性細胞数の割合の変化を解析した。結果は以下の通りである。

1) 生後マウスの歯小囊および歯根膜に *SIX1* の発現が観察された。経時的解析の結果、将来の歯根膜となる歯小囊全体に *SIX1* が強発現するが、歯根膜の成熟とともに *SIX1* の発現が弱まり、*SIX1* 発現細胞数も減少した (図 3)。

2) 歯根成長期の PN14 では歯根膜も発達段階にあり、*SIX1* 陽性細胞が多く観察された。歯根と歯根膜の盛んな形成を裏付けるように EdU で標識される増殖性細胞は歯根膜全体に数多く存在した。一方で歯根完成期の PN28 では歯根膜もほぼ完成し、*SIX1* 発現細胞の減少と平行して増殖性細胞数の減少が見られた (図 5)。

3) 野生型マウスと *Six1* 欠損ホモマウスの歯小囊における増殖性細胞数の割合を比較した結果、*Six1* 欠損ホモマウスの増殖性細胞数の割合は、野生型と比較して統計的に有意に減少していた (図 7)。

4) ヒト培養歯根膜細胞は、ほぼ全ての細胞が *SIX1* を発現していた。また、この細

胞は歯根膜幹細胞/前駆細胞を含む細胞集団であることが示唆された (図 8, 9, 10, 11)。

5) ヒト培養歯根膜細胞の、*SIX1* の機能を阻害した場合には、機能阻害しない場合と比較して、増殖性細胞数の割合に統計的に有意な減少が見られた (図 16)。

これらの結果から、歯根膜発生において、*SIX1* が歯根膜に分化する前の歯根膜前駆細胞に発現することと、歯根膜細胞の増殖性と *SIX1* の発現には相関があること、さらに *Six1/SIX1* は歯根膜前駆細胞や培養歯根膜細胞に発現し、細胞増殖を担うことが示された。

6. 謝辞

本研究は自治医科大学分子病態治療研究センター・細胞生物研究部、川上潔教授のご指導とご支援のもとに行われたものであり、ここに深く感謝の意を表します。また、私にこのような研究の機会を与えて下さりました自治医科大学大学院医学研究科歯科口腔外科 森良之教授 及び 草間幹夫名誉教授（現国際医療福祉大学教授、歯科口腔外科センター長）に謝意を表します。本研究の立案、遂行において始終ご指導を賜りました自治医科大学分子病態治療研究センター・細胞生物研究部 高橋将文講師 および矢嶋浩講師に深く謝意を表します。また実験手法のご指導を頂きました自治医科大学分子病態治療研究センター・細胞生物研究部、佐藤滋准教授および杉本大樹助教に厚く感謝申し上げます。最後に、自治医科大学分子病態治療研究センター・細胞生物研究部ならびに歯科口腔外科講座の皆様にご心より御礼申し上げます。

7. 参考文献

Achilleos, A. and P.A. Trainor. "Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy." *Cell Res* 22(2):288-304. 2012.

Alberton, P., S. Dex, C. Popov, C. Shukunami, M. Schieker, and D. Docheva. "Loss of tenomodulin results in reduced self-renewal and augmented senescence of tendon stem/progenitor cells." *Stem Cells Dev* 24(5):597-609. 2015.

Avery, J.K., P.F. Steele, and N. Avery. *Oral development and histology*. Stuttgart ; New York: Thieme. 2002.

Basdra, E.K. and G. Komposch. "Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis." *Eur J Orthod* 19(6):615-621. 1997.

Chai, Y., X. Jiang, Y. Ito, P. Bringas, Jr., J. Han, D.H. Rowitch, P. Soriano, A.P. McMahon, and H.M. Sucov. "Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis." *Development* 127(8):1671-1679. 2000.

Chamila Prageeth Pandula, P.K., L.P. Samaranayake, L.J. Jin, and C. Zhang. "Periodontal ligament stem cells: an update and perspectives." *J Investig Clin Dent* 5(2):81-90. 2014.

Chehrehasa, F., A.C. Meedeniya, P. Dwyer, G. Abrahamsen, and A. Mackay-Sim. "EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system." *J Neurosci Methods* 177(1):122-130. 2009.

Coletta, R.D., K. Christensen, K.J. Reichenberger, J. Lamb, D. Micomonaco, L. Huang, D.M. Wolf, C. Muller-Tidow, T.R. Golub, K. Kawakami, and H.L. Ford. "The Six1 homeoprotein stimulates tumorigenesis by reactivation of cyclin A1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17):6478-6483. 2004.

Docheva, D., E.B. Hunziker, R. Fassler, and O. Brandau. "Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation." *Mol Cell Biol*

25(2):699-705. 2005.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 8(4):315-317. 2006.

Ford, H.L., E.N. Kabingu, E.A. Bump, G.L. Mutter, and A.B. Pardee. "Abrogation of the G2 cell cycle checkpoint associated with overexpression of HSIX1: a possible mechanism of breast carcinogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21):12608-12613. 1998.

Fujimoto, Y., S.S. Tanaka, Y.L. Yamaguchi, H. Kobayashi, S. Kuroki, M. Tachibana, M. Shinomura, Y. Kanai, K. Morohashi, K. Kawakami, and R. Nishinakamura. "Homeoproteins Six1 and Six4 Regulate Male Sex Determination and Mouse Gonadal Development." *Developmental Cell* 26(4):416-430. 2013.

Giordani, J., L. Bajard, J. Demignon, P. Daubas, M. Buckingham, and P. Maire. "Six proteins regulate the activation of *Myf5* expression in embryonic mouse limbs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(27):11310-11315. 2007.

Grifone, R., J. Demignon, C. Houbron, E. Souil, C. Niro, M.J. Seller, G. Hamard, and P. Maire. "Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo." *Development* 132(9):2235-2249. 2005.

Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S.J. Elledge. "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." *Cell* 75(4):805-816. 1993.

Howard, P.S., U. Kucich, R. Taliwal, and J.M. Korostoff. "Mechanical forces alter extracellular matrix synthesis by human periodontal ligament fibroblasts." *J Periodontal Res* 33(8):500-508. 1998.

Huang, G.T., S. Gronthos, and S. Shi. "Mesenchymal stem cells derived from

dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine." *J Dent Res* 88(9):792-806. 2009.

Ikeda, K., S. Ookawara, S. Sato, Z. Ando, R. Kageyama, and K. Kawakami. "Six1 is essential for early neurogenesis in the development of olfactory epithelium." *Dev Biol* 311(1):53-68. 2007.

Ikeda, K., Kageyama, R., Suzuki, Y., & Kawakami, K." Six1 is indispensable for production of functional progenitor cells during olfactory epithelial development." *Int J Dev Biol* 54(10):1453-1464. 2010.

Itaya, T., Kagami, H., Okada, K., Yamawaki, A., Narita, Y., Inoue, M., Sumita, Y. and M. Ueda."Characteristic changes of periodontal ligament-derived cells during passage." *J Periodontal Res* 44(4):425-433. 2009.

岩田隆紀. 石川烈. 再生医療叢書 8 歯学系. 朝倉書店,2012,40-49

Jean, D., Bernier, G., Gruss, P." Six6 (Optx2) is a novel murine Six3-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk" *Mech Dev*, 84(1-2): 31-40.1999.

Kawakami, K., S. Sato, H. Ozaki, and K. Ikeda. "Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development." *Bioessays* 22(7):616-626. 2000.

Kawamoto, T. "Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants". *Arch Histol Cytol*, 66, 123-143. 2003.

Kobayashi, H., K. Kawakami, M. Asashima, and R. Nishinakamura. "Six1 and Six4 are essential for Gdnf expression in the metanephric mesenchyme and ureteric bud formation, while Six1 deficiency alone causes mesonephric-tubule defects." *Mech Dev* 124(4):290-303. 2007.

Komiyama, Y., S. Ohba, N. Shimohata, K. Nakajima, H. Hojo, F. Yano, T. Takato,

D. Docheva, C. Shukunami, Y. Hiraki, and U.I. Chung. "Tenomodulin expression in the periodontal ligament enhances cellular adhesion." *PLoS One* 8(4):e60203. 2013.

Konishi, Y., K. Ikeda, Y. Iwakura, and K. Kawakami. "Six1 and Six4 promote survival of sensory neurons during early trigeminal gangliogenesis." *Brain Res* 1116(1):93-102. 2006.

Laclef, C., G. Hamard, J. Demignon, E. Souil, C. Houbron, and P. Maire. "Altered myogenesis in Six1-deficient mice." *Development* 130(10):2239-2252. 2003a.

Laclef, C., E. Souil, J. Demignon, and P. Maire. "Thymus, kidney and craniofacial abnormalities in Six1 deficient mice." *Mechanisms of Development* 120(6):669-679. 2003b.

Le Grand, F., R. Grifone, P. Mourikis, C. Houbron, C. Gigaud, J. Pujol, M. Maillet, G. Pages, M. Rudnicki, S. Tajbakhsh, and P. Maire. "Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration." *J Cell Biol* 198(5):815-832. 2012.

Li, X., K.A. Oghi, J. Zhang, A. Kronen, K.T. Bush, C.K. Glass, S.K. Nigam, A.K. Aggarwal, R. Maas, D.W. Rose, and M.G. Rosenfeld. "Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis." *Nature* 426(6964):247-254. 2003.

Li, Z., T. Tian, F. Lv, Y. Chang, X. Wang, L. Zhang, X. Li, L. Li, W. Ma, J. Wu, and M. Zhang. "Six1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells via upregulation of cyclin D1 expression." *PLoS One* 8(3):e59203. 2013.

Lindroos, B., K. Maenpaa, T. Ylikomi, H. Oja, R. Suuronen, and S. Miettinen. "Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 368(2):329-335. 2008.

Mayo, V., Y. Sawatari., Huang, C. Y. & Garcia-Godoy, F. "Neural crest-derived dental stem cells--where we are and where we are going". *J Dent*, **42**, 1043-1051.

2015.

McCoy, E.L., R. Iwanaga, P. Jedlicka, N.S. Abbey, L.A. Chodosh, K.A. Heichman, A.L. Welm, and H.L. Ford. "Six1 expands the mouse mammary epithelial stem/progenitor cell pool and induces mammary tumors that undergo epithelial-mesenchymal transition." *J Clin Invest* 119(9):2663-2677. 2009a.

McCoy, E.L., K. Kawakami, H.L. Ford, and R.D. Coletta. "Expression of Six1 homeobox gene during development of the mouse submandibular salivary gland." *Oral Dis* 15(6):407-413. 2009b.

Murchison, N.D., B.A. Price, D.A. Conner, D.R. Keene, E.N. Olson, C.J. Tabin, and R. Schweitzer. "Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons." *Development* 134(14):2697-2708. 2007.

Neph, S., A.B. Stergachis, A. Reynolds, R. Sandstrom, E. Borenstein, and J.A. Stamatoyannopoulos. "Circuitry and dynamics of human transcription factor regulatory networks." *Cell* 150(6):1274-1286. 2012.

Nonomura, K., M. Takahashi, Y. Wakamatsu, T. Takano-Yamamoto, and N. Osumi. "Dynamic expression of Six family genes in the dental mesenchyme and the epithelial ameloblast stem/progenitor cells during murine tooth development." *J Anat* 216(1):80-91. 2010.

Oliver, G., A. Mailhos, R. Wehr, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and P. Gruss, "Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development". *Development* 121(12): 4045-4055. 1995.

Ozaki, H., K. Nakamura, J. Funahashi, K. Ikeda, G. Yamada, H. Tokano, H.O. Okamura, K. Kitamura, S. Muto, H. Kotaki, K. Sudo, R. Horai, Y. Iwakura, and K. Kawakami. "Six1 controls patterning of the mouse otic vesicle." *Development* 131(3):551-562. 2004.

Ozer, A., G. Yuan, G. Yang, F. Wang, W. Li, Y. Yang, F. Guo, Q. Gao, L. Shoff, Z. Chen, I.C. Gay, K.J. Donly, M. MacDougall, and S. Chen. "Domain of dentine sialoprotein mediates proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells." *PLoS One* 8(12):e81655. 2013.

Peters, H. and R. Balling. "Teeth. Where and how to make them." *Trends Genet* 15(2):59-65. 1999.

Rothova, M., R. Peterkova, and A.S. Tucker. "Fate map of the dental mesenchyme: dynamic development of the dental papilla and follicle." *Dev Biol* 366(2):244-254. 2012.

Saito, Y., T. Yoshizawa, F. Takizawa, M. Ikegame, O. Ishibashi, K. Okuda, K. Hara, K. Ishibashi, M. Obinata, and H. Kawashima. "A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2." *J Cell Sci* 115(Pt 21):4191-4200. 2002.

Sakuraba, H., Fujiwara, N., Sasaki-Oikawa, A., Sakano, M., Tabata, Y., Otsu, K., Ishizeki, K., Harada, H. "Hepatocyte growth factor stimulates root growth during the development of mouse molar teeth." *J Periodontal Res* 47: (1). 2012.

Sato, S., K. Ikeda, G. Shioi, H. Ochi, H. Ogino, H. Yajima, and K. Kawakami. "Conserved expression of mouse Six1 in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the rostral PPR." *Developmental Biology* 344(1):158-171. 2010.

Schweitzer, R., J.H. Chyung, L.C. Murtaugh, A.E. Brent, V. Rosen, E.N. Olson, A. Lassar, and C.J. Tabin. "Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments." *Development* 128(19):3855-3866. 2001.

Self, M., O.V. Lagutin, B. Bowling, J. Hendrix, Y. Cai, G.R. Dressler, and G. Oliver. "Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney." *EMBO J* 25(21):5214-5228. 2006.

Seo, B.M., M. Miura, S. Gronthos, P.M. Bartold, S. Batouli, J. Brahim, M. Young, P.G. Robey, C.Y. Wang, and S. Shi. "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament." *Lancet* 364(9429):149-155. 2004.

Shimono, M., T. Ishikawa, H. Ishikawa, H. Matsuzaki, S. Hashimoto, T. Muramatsu, K. Shima, K. Matsuzaka, and T. Inoue. "Regulatory mechanisms of periodontal regeneration." *Microsc Res Tech* 60(5):491-502. 2003.

Shukunami, C., Y. Oshima, and Y. Hiraki. "Molecular cloning of tenomodulin, a novel chondromodulin-I related gene." *Biochem Biophys Res Commun* 280(5):1323-1327. 2001.

須田立雄.小澤英浩.高橋榮明 他編.新骨の科学.医歯薬出版株式会社,2007

Suzuki, Y., K. Ikeda, and K. Kawakami. "Regulatory role of Six1 in the development of taste papillae." *Cell Tissue Res* 339(3): 513-525.2010.

Suzuki, Y., K. Ikeda, and K. Kawakami. "Development of gustatory papillae in the absence of Six1 and Six4." *J Anat* 219(6): 710-721.2011.

辻孝.再生医療叢書 8 歯学系.朝倉書店,2012,167-178

Wu, W., Z. Ren, P. Li, D. Yu, J. Chen, R. Huang, and H. Liu. "Six1: a critical transcription factor in tumorigenesis." *Int J Cancer* 136(6):1245-1253. 2015.

Yajima, H., N. Motohashi, Y. Ono, S. Sato, K. Ikeda, S. Masuda, E. Yada, H. Kanasaki, Y. Miyagoe-Suzuki, S. Takeda, and K. Kawakami. "Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells." *Exp Cell Res* 316(17):2932-2944. 2010.

Yamamoto-Shiraishi, Y. and A. Kuroiwa. "Wnt and BMP signaling cooperate with Hox in the control of Six2 expression in limb tendon precursor." *Dev Biol* 377(2):363-374. 2013.

Yokoi, T., M. Saito, T. Kiyono, S. Iseki, K. Kosaka, E. Nishida, T. Tsubakimoto, H.

Harada, K. Eto, T. Noguchi, and T. Teranaka. "Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo." *Cell Tissue Res* 327(2):301-311. 2007.

Zheng, W., L. Huang, Z.B. Wei, D. Silvius, B. Tang, and P.X. Xu. "The role of Six1 in mammalian auditory system development." *Development* 130(17):3989-4000. 2003.