

令和元年6月7日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15774

研究課題名(和文) 胚性幹細胞を用いた歯の器官形成過程の解析及び歯の器官形成の試み

研究課題名(英文) Analysis of process of tooth organogenesis using embryonic stem cells and attempt of tooth organogenesis using them

研究代表者

山崎 英俊 (YAMAZAKI, HIDETOSHI)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00283987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウス胚性幹細胞株から象牙芽細胞特異的遺伝子Dspやエナメル芽細胞特異的遺伝子Amelxの発現を誘導できる培養系を確立した。培養系で象牙芽細胞やエナメル芽細胞が誘導されているかを明らかにするために象牙芽細胞を緑色蛍光、エナメル芽細胞を赤色蛍光で検出できるマウスを作成し、象牙芽細胞及びエナメル芽細胞が蛍光標識できることを確認した。エナメル芽細胞及び象牙芽細胞を蛍光検出できる胚性幹細胞株を用いて試験管内で象牙芽細胞とエナメル芽細胞の誘導を試みたが、同定には至っていない。胚性幹細胞株と正常マウス歯上皮や歯間葉細胞を混合し、歯胚形成における胚性幹細胞由来の蛍光細胞の歯への寄与を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、マウス胚性幹細胞株から歯の構成細胞の効率的誘導及び歯の器官形成を目的とし、象牙芽細胞を緑色蛍光でエナメル芽細胞を赤色蛍光で検出できるマウス及び胚性幹細胞株を作成した。我々は初めて象牙芽細胞とエナメル芽細胞を別蛍光で同一個体で検出できる系を確立し、これらを用いて試験管内及び生体内で歯の構成細胞がどのような性質を持ち、どのように歯の器官形成に寄与するかを検討しており、その学術的意義は高い。近年、再生医療の進歩は目ざましいが歯の再生の実用化は進んでいない。義歯、インプラントに加えて歯の再生医療という新たな選択肢が増えることは口腔の機能保全というニーズに大きく関わっており、社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：By using mouse embryonic stem cells, we found that cells from ES cell culture expressed Dsp or Amelx. To investigate if Dsp-expressing odontoblasts or Amelx-expressing ameloblasts were induced from ESCs in this culture, we had established Amelx-TdTomato Knock In (Amelx TdTomato/+) mice and Dsp-GFP knock In (Dsp GFP/+) mice to identify ameloblasts and odontoblasts as TdTomato-expressing cells, and GFP-expressing cells, respectively. Using these mice, we found that TdTomato and GFP were strongly expressed on ameloblasts and odontoblasts, respectively. Furthermore, we had established ES cell lines from these transgenic mice. Although we tried to induce GFP-expressing odontoblast and TdTomato-expressing ameloblasts from ESC cultures, we had not identified odontoblasts and ameloblasts from ESCs. Using cells from embryonic stem cells with dental epithelium and dental mesenchyme of wild-type embryos and try to examine the contribution of cells from ESCs to tooth formation.

研究分野：歯の発生、器官形成

キーワード：神経堤細胞 象牙芽細胞 エナメル芽細胞 胚性幹細胞 歯の器官形成 蛍光標識

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の形成は神経堤由来の歯間葉と歯上皮との相互作用により進行し、歯間葉は主に象牙芽細胞に歯上皮はエナメル芽細胞に分化する。歯の発生に深く関わる頭部神経堤細胞は骨や象牙芽細胞等への分化能を持ち、歯間葉細胞は象牙芽細胞のみならず骨、軟骨、脂肪にも分化できる。本研究では、象牙芽細胞特異的遺伝子 *Dentin sialophosphoprotein (Dspp)* とエナメル芽細胞特異的遺伝子 *Amelogenin (Amelx)* の発現に焦点を置いた。我々は *Dspp* 遺伝子の制御領域を単離し、*LacZ* を連結したマウスを作成し、前歯・臼歯の象牙芽細胞が *LacZ* を特異的に発現する事を示した。両遺伝子の破壊マウスは、象牙質形成不全、エナメル質形成不全を示し (Sreenath, JBC; 2003, Gibson, JBC; 2001)、両遺伝子の発現の検出は象牙芽細胞やエナメル芽細胞の有効なマーカーとなる可能性が高い。しかし、これらのマウスでは蛍光蛋白の挿入がないことから、両遺伝子の発現を簡単に検出する事はできない。従って、象牙芽細胞とエナメル芽細胞を別蛍光で検出できるマウスを作成し、両遺伝子の発現を簡単に同定・検出できる系を確立することは大変有意義である。近年、マウス胚性幹細胞株から象牙芽細胞様細胞の誘導の報告がある (Kawai, Oral Dis; 2014) が、これらの細胞が生体で象牙芽細胞に分化し、象牙質に寄与できるかは不明である。また、マウス iPS 細胞からエナメル芽細胞誘導の報告がある (Arakaki, JBC, 2012) が、象牙芽細胞の誘導は報告されていない。

2. 研究の目的

歯の形成は、上皮・間葉の相互作用により進行し、歯上皮はエナメル芽細胞に、歯間葉 (神経堤細胞) は象牙芽細胞に分化する。我々は、神経堤由来細胞を蛍光標識出来る胚性幹細胞株を作製し、神経堤細胞を介した *Dentin sialophosphoprotein (Dspp)* 陽性の象牙芽様細胞の培養系を確立した。本培養系にて、エナメル蛋白である *Amelogenin (Amelx)* 遺伝子の発現も確認した。そこで、象牙芽細胞が上皮細胞やエナメル芽細胞とどのように関わり、分化が進行するかを神経堤細胞と上皮細胞を蛍光標識出来る胚性幹細胞株及びマウス歯胚を用いて明らかにし、試験管内誘導系と歯胚の分化過程を比較検討することである。また、神経堤細胞と上皮細胞を蛍光標識出来る胚性幹細胞株と歯胚を用いて胚性幹細胞由来の細胞が歯牙形成に寄与できるかを確認することである。

3. 研究の方法

(1) 象牙芽細胞及びエナメル芽細胞の検出について

- ①象牙芽細胞は神経堤細胞に由来し、特異的遺伝子 *Dspp* を発現する事が知られる。そこで、象牙芽細胞の検出として神経堤由来細胞を検出する事、*Dspp* 遺伝子座に GFP を挿入し、*Dspp* 遺伝子の発現を蛍光で検出できるマウスを作成し、そのマウスから胚性幹細胞株を作成し、実験に用いた。
- ②エナメル芽細胞は上皮細胞に由来し、特異的遺伝子 *Amelx* を発現する事が知られる。そこで、エナメル芽細胞の検出として上皮由来細胞を検出する事、*Amelx* 遺伝子座に別蛍光蛋白の TdTomato を挿入し、*Amelx* 遺伝子の発現を蛍光で検出できるマウスを作成し、そのマウスから胚性幹細胞株を作成し、実験に用いた。
- ③象牙芽細胞とエナメル芽細胞を同一個体で別蛍光で検出することを目的に、象牙芽細胞及びエナメル芽細胞を蛍光標識できるマウスを交配し、二重遺伝子組み換えマウスを作成した。これらのマウスを用いて、歯胚・歯髄、器官培養にて象牙芽細胞及びエナメル芽細胞を蛍光蛋白で検出可能かを検討した。
- ④胚性幹細胞を用いて、試験管内で BMP4 等の因子を添加し、2週間程培養し、様々な酵素を用いて単一細胞化し、RNA 解析、フローサイトメトリー解析を行った。

4. 研究成果

- ①我々は、マウス胚性幹細胞株から *Dspp*, *Amelx mRNA* の発現を指標に象牙芽細胞、エナメル芽細胞様の細胞の試験管内誘導に成功した (図 1)。また、間葉系遺伝子である 2 型コラーゲンや OCN 等の発現が認められ、硬組織が誘導されている事、cytokeratin の発現から、間葉系に加えて上皮系の細胞も誘導されている事が示された。
- ②我々は象牙芽細胞を蛍光で検出するために、象牙芽細胞特異的な遺伝子 *Dspp* の遺伝

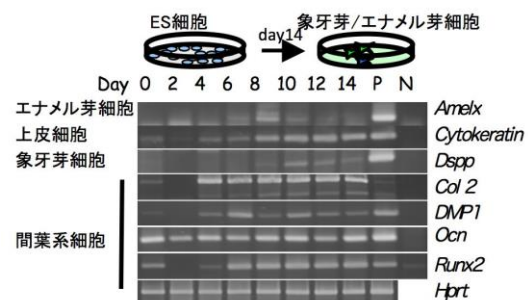


図1 神経堤細胞を蛍光標識出来る胚性幹細胞から象牙芽・エナメル芽細胞の分化誘導

子座に緑色蛍光蛋白 GFP を挿入したマウス (*Dspp-GFP*)、エナメル芽細胞を蛍光で検出するために、エナメル芽細胞特異的な遺伝子 Amelogenin の遺伝子座に赤色蛍光タンパク TdTomato を挿入した *Amelx-TdTomato* マウスを作成した (図2)。本マウスでは確かに、エナメル芽細胞が TdTomato 陽性、象牙芽細胞が GFP 陽性である事がわかった (図3)。

③象牙芽細胞とエナメル芽細胞を同時に別蛍光で検出する目的で、(*Dspp-GFP*)マウスと (*Amelx-TdTomato*)マウスを交配し、二重遺伝子改変マウスを樹立した。

④*Dspp-GFP/+*マウス及び *Amelx-TdTomato*マウスの象牙芽細胞やエナメル芽細胞が蛍光陽性であることを歯胚細胞を用いたフローサイトメトリ解析にて、GFP 陽性細胞及び Tdtomato 陽性細胞が単離出来ることも明らかにした。

⑤現在、二重遺伝子改変マウス *Dspp-GFP/GFP;Amelx-TdTomato* マウスから、象牙芽細胞とエナメル芽細胞を試験管内で二重標識できる胚性幹細胞株の樹立を行っている。

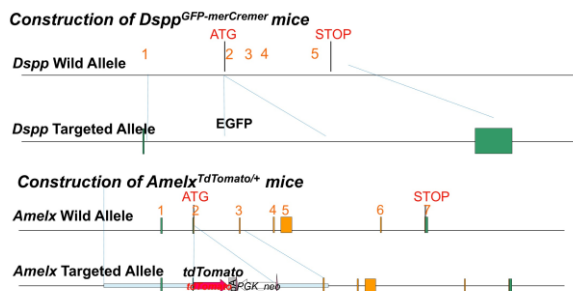


図2：作製した遺伝子組換え胚性幹細胞・マウスの遺伝子図

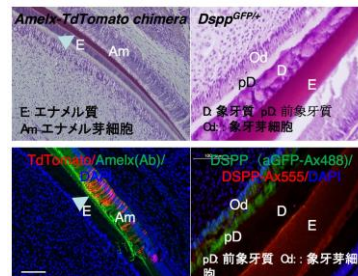


図3：*Dspp-GFP/+*マウス、*Amelx-TdTomato*キメラマウスのGFP陽性、TdTomato陽性細胞は、抗*Dspp*抗体、抗Amelx抗体陽性で象牙芽細胞、エナメル芽細胞(エナメル質含む)と一致する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4件)

- ① Yamane T. Mouse Yolk Hematopoiesis. *Front Cell Dev Biol.* (査読有) 6:80. doi: 10.3389/fcell.2018.00080. eCollection 2018.
- ② Tsunokuma N, Yamane T, Matsumoto C, Tsuneto M, Isono K, Imanaka-Yoshida K, Yamazaki H. Depletion of Neural Crest-Derived Cells Leads to Reduction in Plasma Noradrenaline and Alters B Lymphopoiesis. *J. Immunol.* (査読有) (198(1):156-169 (2017)
- ③ Yamane T, Ito C, Washino A, Isono K, Yamazaki H. Repression of primitive erythroid program is critical for the initiation of multi-lineage hematopoiesis in mouse development. *J Cell Physiol.* (査読有) 232(2):323-330 (2017). doi: 10.1002/jcp.25422.
- ④ Yamanaka K, Nakanishi T, Isono K, Hasegawa C, Inada H, Mizutani K, Matsushima Y, Okada K, Mabuchi T, Kondo M, Yamagiwa A, Kakeda M, Habe K, Nosaka T, Gabazza EC, Yamazaki H, Mizutani H, Kawano M. Restrictive IL-10 induction by an innocuous parainfluenza virus vector ameliorates nasal allergy. *J Allergy Clin Immunol.* (査読有) S0091- 6749(16)30627-3. (2016) doi:10.1016/j.aci.2016.05.044

〔学会発表〕 (計 10件)

- ① 磯野加奈、山崎英俊 象牙芽細胞及びエナメル芽細胞を蛍光標識出来るマウスを用いた象牙芽細胞、エナメル芽細胞前駆細胞の同定の試み 第60回 歯科基礎医学会学術大会 2018年9月5-7日 九州大学病院キャンパス百年記念講堂(福岡市)
- ② 山崎英俊、角熊直樹、彦坂茉里、山根俊之 Depletion of Neural crest-derived cells leads to reduction of plasma noradrenalin and alters T lymphopoiesis. 第47回日本免疫学会学術集会 2018年12月10-12日福岡国際会議場 (福岡市)
- ③ 彦坂茉里、山根俊之、山崎英俊 An attempt to detect follicular dendritic cells in ectopic lymphoid tissues. 第47回日本免疫学会学術集会 2018年12月10-12日 福岡国際会議場 (福岡市)
- ④ 山根俊之、彦坂茉里、山崎英俊 York sac progenitors for tissue-resident macrophages. 第47回日本免疫学会学術集会 2018年12月10-12日 福岡国際会議場 (福岡市)
- ⑤ 磯野加奈、彦坂茉里、山崎英俊 歯を蛍光標識できるマウスを用いた歯の前駆細胞の単離の試み 第47回三重口腔外科学会 2018年12月8日 三重県歯科医師会館(三重県津市)
- ⑥ 彦坂茉里、磯野加奈、山崎英俊 口腔内所属リンパ節での免疫活性化場を形成する細胞の検出の試み 第47回三重口腔外科学会 2018年12月8日 三重県歯科医師会館(三重県津市)
- ⑦ 磯野加奈、山崎英俊 象牙芽細胞及びエナメル芽細胞を蛍光標識出来るマウスを用いた象牙芽細胞、エナメル芽細胞の同定と単離の試み 第59回 歯科基礎医学会学術大会

2017年9月16-18日 松本歯科大学キャンパス(松本市)

- ⑧ 磯野加奈、山崎英俊 蛍光を指標にした象牙芽細胞とエナメル芽細胞の同定と単離
第46回三重口腔外科学会 2017年12月8日 三重県歯科医師会館(三重県)
- ⑨ 山根俊之、伊藤千絵、山崎英俊 胚発生初期の卵黄嚢における多能性造血の開始機構. 第7
8回日本血液学会学術集会 2016年10月13-15日 パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑩ YAMANE TOSHIYUKI, YAMAZAKI HIDETOSHI Characterization of embryonic day-9derived B
progenitors. 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月05-06日 沖縄コンベンション
センター、ラグナガーデンホテル(沖縄県宜野湾市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山根 俊之

ローマ字氏名：(YAMANE, TOSHIYUKI)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30452220

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。