

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

A>>7D>>77 => >77 A>>77 88
 kuy"
 y{TAAsspAKV
 AKKv\$PK
 NK
 Dentin sialophosphoprotein (Dssp)SKV
 Amelogenin(Amelx)hv 0j hz Dssp 0q
 b| LacZ ° Cb|bKW LacZ Pd
 0j} "w{IT;|OT;0
 (Sreenath,JBC;2003, Gibson,JBC;2001)AKKV
 y 6ESDbb^
 sMzD} Jnq IKvBK
 WubvK si
 dsrM } 0SK0WY
 M (Kawai,Oral Dis;2014)WVVKPv+
 M iPS KVKV M Arakaki,JBC,
 2012¥ WED}

□
 yAKK
 KK(K)TKV 6dSK0
 b(Kkbj Dentin sialophosphoprotein(Dssp)GS|Kv
 bM Amelogenine(Amelx)0h^
 r|KvKvK
 vK 6dSK00q 04.
 sdvW dsrM (KvKv
 dSK00 0qSKvWv# ds
 rM }

0Q
 KV 0KV yv 0Oq
 IKv (KV T b# Dssp EdW| GFP 0 Dssp
 I KvGTKW| Dssp 0v
 0w|b|S0b0
 i0j} Amelx EdW h|
 0 IKv Kv| Amelx 0v y
 0 IKvq TKW|
 TdTomato 0 Amelx 0w|b|y
 dSK0b0j} 0rrMSE | IKV
 IKvKv 0rMSE ^
 0V 000b| IKVKV > *
 0 0q9 0
 rWv
 dSK00q. BMP4 0Ab| 0
 0q KV 0 | RNA t0j}

2|2□
 q Cc <0y4? } Dssp,
 Amelx mRNA b0B, F(y...
 0F (yb (yb 006 1B
 K S 1> rS6°(060"
 0 OCN b006
)0 Z8f cytokeratin b #
 ? 6°(00(yv1L
 Z80 0lS
 rC c1B 3, F(y. 0Su
 1B, F(y10G° Dssp b4G

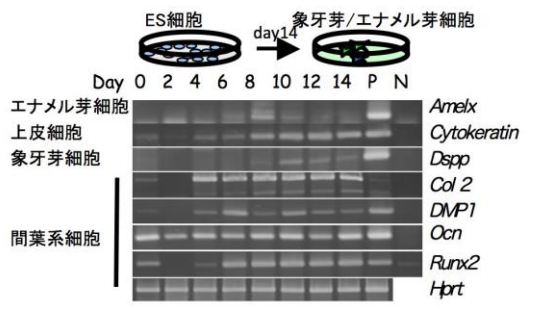


図1 神経堤細胞を蛍光標識出来る胚性幹細胞から象牙芽・エナメル芽細胞の分化誘導

GFP KS←
 (Dsp⁺-GFP) (y. f)
 MSu (y. f)
 Amelogenin b4G (y. f)
 TdTomato KS ← Amelx-TdTomato ←
 8BKS (y. f)
 TdTomato 7g (y. f)
 +@ GFP 7g (y. f)
 s1B, F (y. f)
 (Dsp⁺-GFP) ←
 (Amelx-TdTomato) 4K
 ° 5← g KS
 t Dsp⁺-GFP/+kg
 x (y. f)
 B O O O
 O y (y. f)
 u 5#G5←
 7B, F (y. f)
 1A+ (y. f)

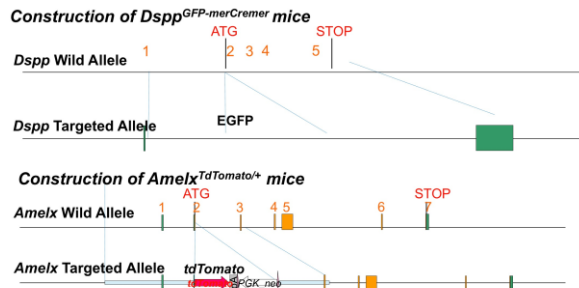


図2：作製した遺伝子組換え胚性幹細胞・マウスの遺伝子図

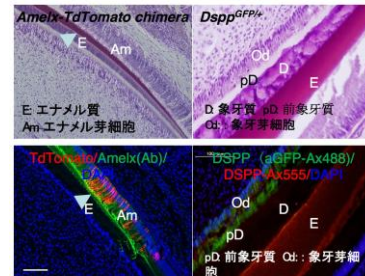


図3：Dsp⁺-GFP/+マウス、Amelx-TdTomato キメラマウスのGFP陽性。TdTomato陽性細胞は、抗Dsp抗体、抗Amelx抗体陽性で象牙芽細胞。エナメル芽細胞(エナメル質含む)と一致する。

□ Yamane T. Mouse Yolk Hematopoiesis. Front Cell Dev Biol. (1w) 6: 80. doi: 10.3389/fcell.2018.00080. eCollection 2018.

r 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. (1w) (198(1): 156-169 (2017)

s 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. (1w) 232(2): 323-330 (2017). doi: 10.1002/jcp.25422.

t Yamanaka K, Nakaniishi 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. (1w) S0091- 6749(16)30627-3. (2016) doi: 10.1016/j.aci.2016.05.044R

□ Fe Depletion of Neural crest-derived cells leads to reduction of plasma noradrenalin and alters T lymphopoiesis. 60 G (w) 2018 " 9 v 5-7 ¥ (w)

r Fe Depletion of Neural crest-derived cells leads to reduction of plasma noradrenalin and alters T lymphopoiesis. 47 G (w) 2018 " 12 v 10-12 ¥ (w)

s j, x5 Fe An attempt to detect follicular dendritic cells in ectopic lymphoid tissues. 47 G (w) 2018 " 12 v 10-12 ¥ (w)

t j, x5 Fe York sac progenitors for tissue-resident macrophages. 47 G (w) 2018 " 12 v 10-12 ¥ (w)

u j, x5 Fe Depletion of neural crest-derived cells leads to reduction of plasma noradrenalin and alters T lymphopoiesis. 47 GU5+M (w) 2018 " 12 v 8 ¥ U5% (w)

v j, x5 Fe +M BM (y. b) 47 GU5+M (w) 2018 " 12 v 8 ¥ U5% (w)

w j, x5 Fe Depletion of neural crest-derived cells leads to reduction of plasma noradrenalin and alters T lymphopoiesis. 59 G (w) 2018 " 12 v 8 ¥ U5% (w)

2017 " 9 v 16-18 ¥ (w)
 x Fe . S1B, F(y)F(yb)†
 46 GU5+M 2017 " 12 v 8 ¥ U5 (U5%)
 y () . Fe + 8; /b6 . 5
 6G¥ 2016 " 10 v 13-15 ¥ >
 z YAMANE TOSHIYUKI, YAMAZAKI HI DETOSHI Characterization of embryonic day-9derived B
 progenitors. 45 G 2016 " 12 v 05-06 ¥)
 45 4w>

W&F > 6

S10□ > 6

8
 \$
 8
 88i
 \$
 88
 898

Ny&E > 6

8
 \$
 8
 88i
 \$
 v 8
 898

W
 D.

4> 26)°

(1) 2(,*
 2(8) F
 8 (YAMANE, TOSHIYUKI)
 88 U5□
 48 (12□
 8 M5
 2□ 88□ 30452220

(2) 2% *
 2% 8
 8

d8 ↓ % c % b +01 \ 2i 8Z Mvb[6Su % b x 26Y b 7†. _
 8Zc \ b 0[3:.. _ ö YCvbççç 28Y _ 6iM 0b0 x 2i c 2† _ I rM