

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15802

研究課題名(和文) iPS細胞樹立技術を応用した象牙芽細胞マスター遺伝子の探索

研究課題名(英文) Search of master regulator of odontoblastogenesis using iPS interference

研究代表者

大野 充昭(Ono, Mitsuaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60613156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：象牙芽細胞分化の制御メカニズムのみならず、象牙芽細胞の分化に関わるマスター遺伝子は未だ不明である。そこで、我々は、象牙芽細胞分化に関わるマスター遺伝子の探索を目的に、組織学的・発生学的観点から網羅的解析を行った。その結果、いくつかの象牙芽細胞分化に関わる候補遺伝子を絞り込むことができた。今後、これらの遺伝子の機能解析を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：It is still unknown not only the mechanism but also the master regulator of odontoblastogenesis. Therefore, the final goal of our study is to identify the mater regulator of odontoblastogenesis. We performed the comprehensive analysis from the histological and developmental point of view using RNA-Seq, and could narrow down the several candidate odontoblastogenesis related genes. In the future, we are planing to perform the functional analysis of these candidate genes.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：象牙芽細胞分化 マスター遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

歯の損傷時には歯髄保護のために象牙質の自己修復が起きることが知られており、古くから象牙質再生・歯髄保護に関する研究が多数なされてきた。しかし、歯髄保護を目的に行う直接覆髄法には、明らかな象牙芽細胞誘導作用を有さない水酸化カルシウム製剤が未だに広く用いられており、その予後も不確実である。

一方、修復象牙質形成が誘導される際、刺激により、歯髄内に存在する前駆細胞や歯髄幹細胞が活性化され、新たに象牙芽細胞に分化し、象牙質の再生が生じることが知られており、歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導メカニズムの解明が、象牙芽細胞のマスター遺伝子の同定に繋がると考えられている。これまで多くの研究者により、象牙芽細胞分化のマスター遺伝子の探索がなされてきたが、未だ同定には至っていない。その理由として、歯髄組織より単離した歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導したとする既存培養細胞系は、その細胞形態等から培養細胞が象牙芽細胞と同じ表現形を呈していない可能性があること、組織から特異的に象牙芽細胞と間葉系幹細胞を分離するため Laser Micro-Dissection 法が用いられてきたが、微量の RNA しか採取できないため、RNA 増幅のステップで S/N 比が低下し、精度の高い遺伝子発現プロファイルのデータベースの構築が困難であること、さらに、抽出された遺伝子を絞り込む際にも、遺伝子 KO マウスを複製し表現形を確認する以外に精度の高い確認方法がなく、マスター遺伝子同定の研究効率が悪いことがあった。

近年、歯胚上皮細胞と歯胚間葉細胞を用いて、再生歯胚を創り出す「器官原基法」が開発され、*in vitro*において歯胚発生を忠実に再現することが可能となった。したがって、

発生時期の異なる歯胚間葉組織を経時的に回収することで、細胞培養系を介することなく、未分化な間葉細胞と分化した象牙芽細胞の採取が可能となった。また、次世代シーケンサー (NGS) の開発により、微量の RNA で精度の高い遺伝子解析が可能となり、Laser Micro-Dissection 法においても RNA 増幅のステップを介さない精度の高い解析が可能となった。さらに、iPS 細胞の発見により細胞の分化・未分化制御機構の理解が飛躍的に進み、研究分担者である京都大学 iPS 研究所の渡辺らは、山中4因子とマスター遺伝子候補の転写因子を同時に遺伝子導入すると、マスター

遺伝子を導入した時のみ、iPS 細胞が樹立されないことを明らかにしてきた。つまり、山中4因子よりもマスター遺伝子の方が細胞の性質を方向付ける力が強いことを利用するのである。これらの技術を応用すれば、遺伝子 KO マウスを作る事なく、高感度・ハイスループットに各種細胞分化に係わるマスター遺伝子を同定することが可能である。

## 2. 研究の目的

象牙芽細胞分化時の遺伝子発現プロファイルのデータベースを発生学的、組織学的アプローチで構築し、そのデータベースを用い、iPS 細胞樹立技術を逆手に取ったマスター遺伝子同定法を駆使して象牙芽細胞のマスター遺伝子を同定することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 発生学的アプローチによる象牙芽細胞分化時の遺伝子発現プロファイルのデータベース構築

発生時期の異なるマウス歯胚の間葉組織から採取した未分化な間葉細胞および分化した象牙芽細胞から RNA を精製し、RNA-Seq にて、象牙芽細胞分化時の遺伝子発現プロファイルのデータベースを構築する。

### (2) 組織学的アプローチによる象牙芽細胞分化時の遺伝子発現プロファイルのデータベース構築

生後 30 日齢のイヌ下顎骨より永久歯歯胚を採取し、Laser Micro-Dissection 法にて象牙質にライニングして存在する象牙芽細胞および歯乳頭周囲に存在しこれから象牙芽細胞へと分化する間葉系幹細胞を特異的に採取する。これらの細胞から RNA を精製し、次世代シーケンサー (RNA-Seq) にて、増幅ステップなしで転写因子の発現の差異を網羅的に解析する。

### (3) 実験(1)、(2)の構築データから象牙芽細胞の分化に必須な遺伝子の抽出を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 発生学的アプローチによる象牙芽細胞分化時の遺伝子発現プロファイルのデータベース構築

器官原基法を応用することで、細胞レベルから器官が発生するプロセスを他の周囲組織のノイズの影響を受けないで忠実に再現することが可能となった。本技術を応用し、

器官原基法により再構成された歯胚から経時的にサンプリングし、歯胚発生における上皮細胞および間葉細胞の遺伝子発現プロファイルを構築した。また、歯胚組織から分離した上皮組織、間葉組織を別々に器官培養した後、歯胚を再構成すると歯の発生率が低下することが知られている。そこで、時間と共にどのような遺伝子の発現変化により歯胚発生が抑制されたかを明らかにするため、経時的にサンプリングし、遺伝子発現プロファイルのデータベースを構築し、78の象牙芽細胞の分化に関わる遺伝子の抽出に成功した(図1)。

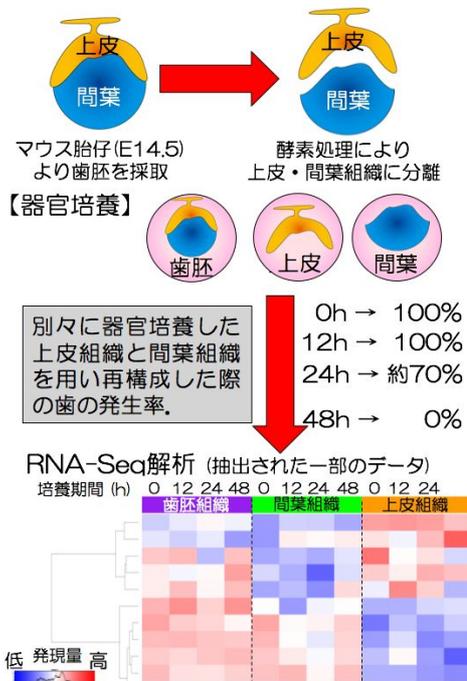
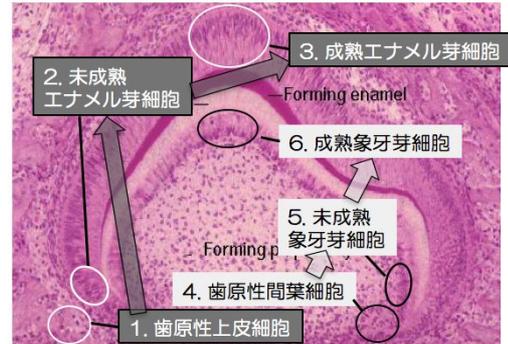


図1. 発生的アプローチによる象牙芽細胞分化に関わる遺伝子のデータベース構築

(2) 組織学的アプローチによる象牙芽細胞分化時の遺伝子発現プロファイルのデータベースの構築

象牙芽細胞は特徴的な細胞形態を呈しており、組織学的に区別可能である。そこで、生後30日齢のイヌ下顎骨より鐘状期歯胚の永久歯 犬歯 歯胚 を採取し、Laser Micro-Dissection法にて、象牙質にライニングして存在する象牙芽細胞および歯乳頭周囲に存在しこれから象牙芽細胞へと分化する間葉系幹細胞から特異的にRNAを採取し、次世代シーケンサー (RNA-Seq) にて、増幅ステップなしで転写因子の発現の差異を網羅的に解

析し、データベースを構築した。図2に主成分解析の結果を示すが、興味深いことに歯原性細胞と、未成熟な象牙芽細胞は類似した遺伝子発現プロファイルを示すのに対し、成熟した象牙芽細胞はそれらと大きく異なる遺伝子発現プロファイルを示した。また、96の象牙芽細胞の分化に関わる遺伝子の抽出に成功した。



上記の細胞をレーザーマイクロディセクション法にて組織よりRNAを回収し、RNA-Seqにて網羅的に比較

主成分解析の結果

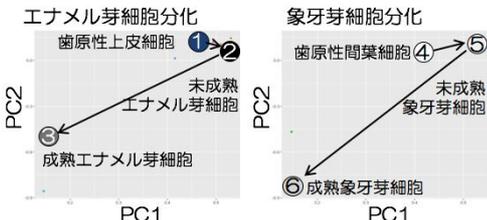


図2. 組織学的アプローチによる象牙芽細胞分化に関わる遺伝子のデータベース構築

(3) 実験(1)、(2)の構築データから象牙芽細胞の分化に必須な遺伝子の絞り込みを行い、大変興味深い遺伝子の抽出に成功した。

今後は、象牙芽細胞分化関連遺伝子として抽出された遺伝子の機能解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

(1) Komori T, Ono M, Hara ES, Ueda J, Nguyen HTT, Nguyen HT, Yonezawa T, Maeba T, Ono A, Takarada T, Momota R, Maekawa K, Kuboki T, Ohashi T, Type IV collagen 6 chain is a regulator of keratin 10 in keratinization of oral mucosal epithelium, Scientific Reports, in press. (査読有)

(2) Ono M, Masaki A, Maeda A, Kilts TM, Hara ES, Komori T, Pham H, Kuboki T, Young MF. CCN4/WISP1 controls cutaneous wound

healing by modulating proliferation, migration and ECM expression in dermal fibroblasts via 5 1 and TNF . Matrix Biol., 17: 30400-6, 2018. (査読有)

(3) Ono M, Oshima M, Ogawa M, Sonoyama W, Hara ES, Oida Y, Shinkawa S, Nakajima R, Mine A, Hayano S, Fukumoto S, Kasugai S, Yamaguchi A, Tsuji T, Kuboki T. Practical whole-tooth restoration utilizing autologous bioengineered tooth germ transplantation in a postnatal canine model. Scientific Reports, 7: 44522. doi: 10.1038/srep44522., 2017. (査読有)

(4) Farahat M, Sathi GA, Hara ES, Taketa H, Kuboki T, Matsumoto T. MSCs feeder layers induce SMG self-organization and branching morphogenesis. PLoS One, 12(4): e0176453. doi:10.1371/journal.pone.0176453., 2017. (査読有)

(5) Sathi GA, Farahat M, Hara ES, Taketa H, Nagatsuka H, Kuboki T, Matsumoto T. MCSF orchestrates branching morphogenesis in developing submandibular gland tissue. J. Cell Sci., 130(9): 1559-1569, 2017. (査読有)

(6) Hara ES, Ono M, Yoshioka Y, Ueda J, Hazehara Y, Pham HT, Matsumoto T, Kuboki T. Antagonistic effects of insulin and TGF- 3 during chondrogenic differentiation of human BMSCs under a minimal amount of factors. Cells Tissues Organs, 201(2): 88-96, 2016. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

(1) 大野充昭, Pham HT, 笈田育尚, 小盛大志, 土佐郁恵, 大橋俊孝, 秋山謙太郎, 窪木拓男. 必須アミノ酸 Tryptophan は骨髄由来間葉系幹細胞の幹細胞性を制御し骨形成を促進する. 第 47 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会(第 37 回公益社団法人日本口腔インプラント学会東北・北海道支部学術大会併催). 仙台, 日本. 2017.9.22-24. 発表日 2017.9.23.

(2) 小盛大志, 大野充昭, 植田淳二, Nguyen TTH, 前川賢治, 窪木拓男. 口腔粘膜上皮の角化制御における Collagen 6 の役割. 第 47 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会(第 37 回公益社団法人日本口腔インプラント学会東北・北海道支部学術大会併催). 仙台, 日本. 2017.9.22-24. 発表日 2017.9.23.

(3) 野村 優, 吉岡裕也, 大野充昭, 國友由

理, 小盛大志, 大橋俊孝, 窪木拓男. DNMT3A の過剰発現は hBMSCs の軟骨細胞分化を促進する. 平成 29 年度公益社団法人日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会. 山口, 日本. 2017.8.26-27. 発表日 2017.8.26.

(4) Komori T, Ueda J, Ono M, Sonoyama W, Hara ES, Yoshioka Y, Maekawa K, Kuboki T. Regulation of gingival keratinization by laminin332. 95th General Session & Exhibition of the IADR. San Francisco, USA. 2017.3.20-25. 発表日 2017.3.23.

(5) Nguyen HT, Ono M, Komori T, Oohashi T, Kuboki T. BMP antagonist inhibitor L51P regulates the chondrogenesis and osteoarthritis. The 65th Annual Meeting of JADR. Tokyo, Japan. 2017.11.18-19. 発表日 2017.11.19.

〔図書〕(計2件)

(1) 歯科再生医療の実現に向けた大型動物モデルにおける機能的な歯の再生. 大島正充, 大野充昭, 辻 孝, 窪木拓男. Bio Industry, 34 巻, 1-11, 2017.

(2) Analysis of CCN4 Function in Osteogenic and Osteoclastic Cells Using Gain and Loss of Function Approaches. Maeda A, Young M, Ono M. CCN Proteins Methods of Molecular Biology;1489:347-359,2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大野 充昭 (ONO Mitsuaki)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
分子医化学分野・助教  
研究者番号：60613156

### (2)研究分担者

窪木 拓男 (KUBOKI Takuo)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
インプラント再生補綴学分野・教授  
研究者番号：00225195

大島正充 (OSHIMA Masamitsu)  
徳島大学大学院医歯薬学研究部  
顎機能咬合再建学分野・准教授  
研究者番号：00548307

大橋 俊孝 (OHASHI Toshitaka)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
分子医化学分野・教授  
研究者番号：50194262

前川 賢治 (MAEKAWA Kenji)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
インプラント再生補綴学分野・准教授  
研究者番号：20304313

渡辺 亮 (WATANABE Akira)  
京都大学iPS細胞研究所  
特定拠点助教  
研究者番号：60506765

### (3)連携研究者

該当なし

### (4)研究協力者

該当なし