

令和元年6月20日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17092

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた歯根形成・維持に關与する分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanisms involving tooth root formation and maintenance using genetic modified mouse.

研究代表者

吉本 由紀 (Yoshimoto, Yuki)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：40735304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題を通して、歯根を含めた頭頸部に疾患または形成不全を示すモデルマウスが樹立された。Sclerostin、Msh homeobox 2、Scleraxis欠失マウスの解析を通して、これまでに報告されている表現系以外の発見も含まれていることに関しては期待以上の成果と考えられる。また樹立したScxGFP iPS細胞は腱・靭帯・歯周靭帯細胞への分化誘導系の構築に有用であることが示された。さらに単層培養でScxGFP iPS細胞からGFP陽性となるin vivoの分化誘導系が樹立され、それを用いて腱・靭帯・歯周靭帯細胞への分化過程における液性因子や低分子化合物の影響が明らかになりつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患モデルマウスの解析ではこれまでに報告されている表現系以外の発見も含まれており、今後さらに歯科領域を含めた頭頸部形成に關与する新たな分子機構の解明につながる可能性がある。ScxGFP iPS細胞を用いたin vitroの腱・靭帯・歯周靭帯細胞への分化過程が可視化できる分化誘導系の構築は国内外でも例を見ない。これまでに個体解析から得られた情報を、本研究で構築した分化誘導系を用いて検証することによって、腱・靭帯・歯根形成過程において前駆細胞に及ぼす影響を明らかにすることが可能となる。本研究の成果を活用することで、細胞を用いた組織再生医療へと応用できる知見が得られると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We established genetic modified mice those have dental or craniofacial abnormalities. Newly phenotypes were discovered from analyses of Sclerostin, Msh homeobox 2, and Scleraxis deficient mice, and that was more than expected. We demonstrated that ScxGFP iPS cells were variable for establishment of in vitro differentiation system for tenocytes, ligamentocytes, and periodontal ligament cells. Culture conditions were identified under that GFP positive cells were differentiated from ScxGFP iPS cell in the monolayer culture. The effects of growth factors and small molecules for the differentiation of tenocytes, ligamentocytes, and periodontal ligament cells have been understanding.

研究分野：分子生物学

キーワード：Msx2 Sost Scx iPS 歯根形成 歯周靭帯

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯冠部では萌出後にエナメル芽細胞が消失する硬いエナメル質と象牙芽細胞によって形成された象牙質が歯髄を外力から保護している。一方、歯根は歯周靭帯によって歯槽骨に固定されており、有細胞セメント質や象牙質も含めて種々の細胞が存在し、生涯にわたって歯根を機能的に維持していく機構が備わっていると考えられている。胎生期に進行するマウスの歯冠形成に関する研究では多くの知見が集積しているが、出生後に形成と成熟が進行する歯根に関しては、硬組織の解析に附随する技術的な問題が基礎的な知見の集積を妨げている。高齢化社会の中で近年歯根や歯周靭帯の再生に向けたニーズは高まっているが、組織形成と維持に関する研究はほとんど進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

*Msh homeobox 2 (Msx2)*は *Msx* ファミリーに属する転写因子である。*Msx2* 欠失マウスにおいては頭蓋や歯根の形成不全が認められ、歯根では *Wnt* の阻害剤である *Sclerostin* をコードする *Sost* 遺伝子の発現が上昇する (*Am J Pathol.* 186, 2577-87, 2016)。*Sost* は硬結性骨化症の原因遺伝子で、欠失マウスでは骨密度が高くなる。*Scleraxis (Scx)*は basic helix-loop-helix 型の転写因子であり、腱・靭帯に特異的に発現する。歯周組織では、*Scx* は象牙芽細胞と歯周靭帯細胞において萌出時に発現が開始する。興味深いことに、歯に矯正力を負荷すると、進展力に応答して発現が上昇し、歯周靭帯で骨化を促進する *Osterix* と拮抗して歯周靭帯の過剰な石灰化を抑制することが明らかとなっている (*Development.*142, 787-96, 2015)。これらの歯根形成過程や腱・靭帯において異常を示すことが報告されている遺伝子改変マウスと、象牙芽細胞や歯周靭帯が蛍光タンパク質によって可視化できるトランスジェニックマウスである *ScxGFP* マウスを用いて、骨格形成及び歯根形成過程を解析する。

また、*ScxGFP* マウスの胎生線維芽細胞(MEF)から樹立した iPS 細胞を用いて、GFP が陽性になるような腱・靭帯または歯周靭帯細の分化に関わるような分子メカニズムの探索を行う。これらの解析によって、歯根形成及び維持に関わる分子機構を明らかにし、再生や予防に応用できるような知見を得ることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) *Sost* 欠失マウス、*Msx2* 欠失マウス、及び *Scx* 欠失マウスの表現系の解析

1. *Sost* 欠失マウス、*Msx2* 欠失マウス、及び *Scx* 欠失マウスの作成

これらの遺伝子の欠失アレルを持つマウスは TALEN を用いて作成した。それぞれヘテロマウス同士を交配してホモマウスを作出した。

2. *Sost* 欠失マウス、*Msx2* 欠失マウス、及び *Scx* 欠失マウスの骨格形成の解析

それぞれの遺伝子欠失マウスの新生児及び成体マウスをイソフルランの吸入により安楽死させた。新生児マウスに関しては、100%エタノールにて脱水後に剥皮し、0.015%アルシアンブルー液にて軟骨を染色後、0.005%アリザリンレッド液にて骨を染色した。1%KOHにて脱色し実体顕微鏡下で観察した。成体マウスに関しては同手順にて安楽死後、4%PFA/PBS溶液にて左心室より灌流固定を行い、同固定液に浸漬後、島津製作所マイクロフォーカス X線 CT システムで骨格を撮影した。

3. 歯根形成の解析

凍結ブロック作成のために、4週齢以上の *Sost* 欠失マウス、*Msx2* 欠失マウス、及び *Scx* 欠失マウスをイソフルラン吸入で安楽死後、すぐに 20%スクロース入り 4%PFA/PBS 溶液を左心室より灌流して固定した。その後 2~3 時間同液に浸漬した後に SCEM に包埋し凍結ブロックを作成した。凍結切片は、ライカのクリオスタットを用いて川本法で 4 μm の厚さで作成した。パラフィンブロック作成は 4%PFA/PBS 溶液にて灌流固定し、モース液にて脱灰、エタノールで脱水後、キシレン置換を行いパラフィン包埋した。パラフィン切片は 6 μm の厚さで作成した。

(2) *Sost* 欠失マウス及び *Msx2* 欠失マウスと *ScxGFP* マウスを交配して得られたマウスの解析

Msx2、*Sost* 欠失アレルを持つヘテロマウスと *ScxGFP* マウスを交配した。GFP 陽性でそれぞれの欠失アレルを保有するマウスを選別し、GFP 陽性ホモマウスを作出するために、さらにヘテロマウスを交配した。

(3) *ScxGFP* iPS 細胞を用いた細胞分化への影響の解析

1. *ScxGFP* iPS 細胞の作成

ScxGFP マウスの胎生線維芽細胞(MEF)からセンダイウイルスを用いて、すでに *ScxGFP* iPS 細胞を作成していたので、iPS 細胞におけるセンダイウイルスの脱落と *ScxGFP* トランスジェン保有をそれぞれ RT-PCR、ゲノム PCR で確認した。

2. *ScxGFP* iPS 細胞の未分化性の確認

ScxGFP iPS 細胞の未分化性をアルカリフォスファターゼ染色により確認した。さらにリア

ルタイム PCR と免疫染色によって、ES 細胞マーカーの発現を確認した。*ScxGFP* iPS 細胞を 96 well 非接着プレートに 1×10^3 細胞/well にて播種し胚様体形成能を確認した。

3. *ScxGFP* iPS 細胞の多能性の確認とキメラ胚の作成

ScxGFP iPS 細胞を免疫抑制マウスである *scid/scid* マウスの皮下もしくは筋中に $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個移植しテラトマを作成した。移植後、4~6 週間後にマウスを安楽死させテラトマを回収し、4%PFA/PBS 溶液にて固定後、20%Sucrose/PBS に浸漬し、OCT に包埋して凍結ブロックを作成した。凍結切片を 8 μm の厚さで作成し、HE 染色、トリイズンブルー染色及び免疫染色を行なった。

また、*ScxGFP* iPS を、野生型 ICR マウスの桑実胚の内部胚葉塊に移植しキメラマウス作成能を確認した。胎生 13 日のキメラ胚を回収し、蛍光実体顕微鏡下にて GFP の発現を確認した。

4. *ScxGFP* iPS 細胞からの分化誘導系の探索

ScxGFP iPS 細胞から形成した胚葉体をゼラチンコートしたディッシュに接着させ、這い出した細胞を 5%血清添加 DMEM/F-12 培地で 3 回継代し、間葉系の前駆細胞を得た。または、*ScxGFP* iPS 細胞をゼラチンコートしたプラスチックプレート上に播種し、コンフルエントに達した時点で、30 μM CHIR、5 μM Cyclopamine を添加し 5 日間培養することで、間葉系の前駆細胞を分化誘導した。これらの方法によって、得られた間葉系前駆細胞に、腱・靭帯に關与することが報告されている液性分子及び低分子化合物を用いて GFP が発現する培養条件を探索した。

4. 研究成果

(1) *Sost* 欠失マウス、*Msx2* 欠失マウス、及び *Scx* 欠失マウスの表現系の解析

Sost 欠失マウス、*Msx2* 欠失マウス、及び *Scx* 欠失マウスの新生仔の骨格解析

新生仔マウスの骨格標本を観察した結果、*Sost* 欠失マウスにおいて、誕生時に頭蓋骨の石灰化の亢進が認められた。また、*Msx2* 欠失マウスにも頭蓋骨形成不全が認められた。*Scx* 欠失マウスにおいては、腱・靭帯付着部軟骨の低形成が認められた。しかしながら、新生仔マウスの骨格標本の解析からは、歯根部形成における表現系を解析することは難しかった。そこで、成体マウスの骨格形成と歯根形成をマイクロ CT で撮影することによって解析した。8 週齢 *Sost* 欠失マウスにおいて長管骨皮質骨や歯槽骨の石灰化亢進が認められた。12 週齢の *Msx2* 欠失マウスにおいては、重度の歯根形成の異常及びエナメル質の形成不全が認められた。6 ヶ月齢の *Scx* 欠失マウスにおいては、下顎骨の筋付着部の低形成や歯根の形成不全が認められた。

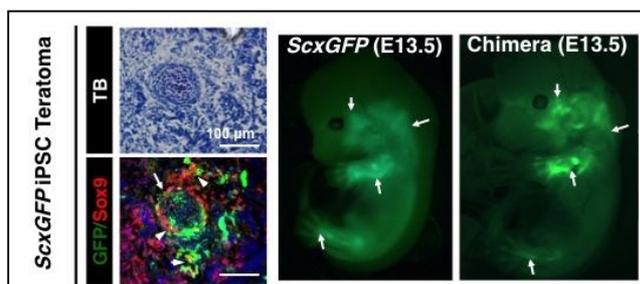
(2) *Sost* 欠失マウス、*Msx2* 欠失マウス、及び *Scx* 欠失マウスの歯根形成の解析

それぞれの遺伝子欠失マウスの組織解析を行うために、凍結ブロックパラフィンブロックを作成したが、より解析を深めるために、歯周組織の形成不全が最も重度であった *Msx2* 欠失マウスに絞って実験を進めた。組織構造はパラフィン切片を HE 染色とトリイズンブルー染色して解析した。また、川本法によって作成した切片で免疫染色を行なった結果、歯根形態の異常とともに歯根根尖部のセメント質もしくは象牙質における Periostine 陽性領域の拡大が認められた。*Msx2* 欠失マウスの歯周靭帯を GFP によって可視化して解析するために、10 回以上の交配を試みたが *ScxGFP*; *Msx2* 欠失マウスが産まれることはなかった。

(3) *ScxGFP* iPS 細胞を用いた細胞分化へ關与する分子機構の探索

センダイウイルスの脱落とトランスジーンの有無を確認した *ScxGFP* iPS 細胞は、ES 細胞同様に未分化マーカーを発現していた。*ScxGFP* iPS 細胞を用いて作成したテラトマの中には、間葉系の疎性結合組織や軟骨の周囲を中心に GFP 陽性細胞が認められたが、腱・靭帯及び歯周組織の形成が明確ではなかった。そこで、*ScxGFP* iPS 細胞を用いてキメラマウスを作成すると、胎生 13 日のキメラ胚において、*ScxGFP* トランスジェニックマウスと同様の GFP 発現パターンが認められ (図) 樹立した *ScxGFP* iPS 細胞は、腱・靭帯・歯周靭帯細胞の分化誘導系の構築に有用であることが判明した。

ScxGFP iPS 細胞由来胚様体から回収した間葉系細胞や、*ScxGFP* iPS 細胞から直接誘導した間葉系前駆細胞に、TGF- β スーパーファミリーに属する液性因子等を添加し培養を行うことで、GFP 陽性の細胞が得られることが分かっている。現在、培養条件を最適化するための検討を行っている。腱・靭帯・歯周靭帯細胞への分化に影響することが報告されている液性因子や低分子化合物を添加し、iPS 細胞の分化にどのような影響を与えるかを検討中である。



図：テラトマとキメラ胚における GFP 陽性細胞

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shukunami C, Takimoto A, Nishizaki Y, Yoshimoto Y, Tanaka S, Miura S, Watanabe H, Sakuma T, Yamamoto T, Kondoh G, Hiraki Y: Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. Scientific Reports. 8, 2018, 3115.

DOI: 10.1038/s41598-018-21194-3. 査読有

吉本 由紀, 宿南 知佐: Scx を中心とした腱・靭帯・歯周靭帯の機能制御. THE BONE, Vol. 33, 2019, 97-103. 査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

吉本 由紀, 滝本 晶、渡邊 仁美、近藤 玄、佐久間 哲史、山本 卓、開 祐司、宿南 知佐、転写因子 Scleraxis は筋骨格系を連結する組織の成熟を制御する. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、<招待講演> (2017. 12 8. 神戸)

吉本 由紀, 宿南 知佐、靭帯分化誘導系構築に向けた ScxGFP iPS 細胞の樹立. 厚生労働省科学研究委託費 (AMED) 後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する基礎研究班ミーティング (2017. 11 25. 東京)

吉本 由紀, 滝本 晶、開 祐司、宿南 知佐、Scx/Sox9 陽性前駆細胞は腱・靭帯付着部の形成に寄与する. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会、<招待講演> (2017. 9. 17. 松本)

吉本 由紀, 滝本 晶、開 祐司、宿南 知佐、basic helix-loop-helix 型転写因子 Scleraxis は腱・靭帯接合部の成熟を制御する. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会 (2017. 7. 27. 博多)

吉本 由紀, 森 健吾、星野 麻里、田中 誠真、渡邊 仁美、佐久間 哲史、山下 寛、岡本 哲治、近藤 玄、山本 卓、開 祐司、宿南 知佐、ゲノム編集技術を用いた鎖骨頭蓋異形成症モデルマウスの作成. 日本ゲノム編集学会第 2 回大会 (2017. 6. 29. 豊中)

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

home.hiroshima-u.ac.jp/tnmd/j_html/j_index.html

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 宿南 知佐

ローマ字氏名: Shukunami Chisa

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。