

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10041

研究課題名(和文)象牙芽細胞とエナメル芽細胞を蛍光標識できるマウスの歯の前駆細胞を用いた歯の形成

研究課題名(英文) Tooth formation using mouse tooth progenitor cells that can fluorescently label odontoblasts and ameloblasts.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：象牙芽細胞特異的遺伝子Dsp α 及びエナメル芽細胞特異的遺伝子Amelxの発現をGFP及びtdTomatoで検出できるDsp α -GFPマウス及びAmelx-tdTomatoマウス、二つの遺伝子改変マウスよりDsp α -GFP；Amelx-tdTomatoマウスを作成し、象牙芽細胞及びエナメル芽細胞を別蛍光を指標に組織学的及びフローサイトメトリーにて同定・単離した。これら二重遺伝子組み換えマウスから胚性幹細胞株を樹立し、別蛍光を指標に試験管内で象牙芽細胞とエナメル芽細胞の誘導を試みている。これらのマウスから培養前は陰性で培養後に蛍光陽性になる象牙芽細胞或いはエナメル芽細胞の前駆細胞を同定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会におけるQuality of lifeは、非常に重要であり、特に歯の維持や歯の再生医療は大きな期待をされている。歯はエナメル質を産生するエナメル芽細胞と象牙質を産生する象牙芽細胞からなり、本研究では、初めて、象牙芽細胞特異的遺伝子dentin sialophosphoprotein及びエナメル芽細胞特異的遺伝子Amelogeninの発現を同一個体で別々の蛍光で検出できるマウスや胚性幹細胞株を作成した。これらの系は蛍光を指標にエナメル芽細胞と象牙芽細胞を簡単に検出することができ、今後期待される歯の試験管内再生や治療の有効な道具となる。

研究成果の概要(英文)：We established Dsp α -GFP; Amelx-tdTomato double transgenic mice, that enable us to detect odontoblasts and ameloblasts as GFP-expressing cells or tdTomato-expressing cells fluorescently. Using these mice, GFP+ odontoblasts and tdtomato+ ameloblasts were identified and isolated by immunohistochemistry and flow cytometry. Furthermore, we have established embryonic stem cell lines from Dsp α -GFP; Amelx-tdTomato double transgenic mice and attempted to induce GFP+ odontoblasts and tdTomato+ ameloblasts in vitro using different fluorescence markers. In addition, from these mice, we have identified progenitor cells of odontoblasts or ameloblasts that are negative before culture but become positive for fluorescence after culture by using tooth organ culture.

研究分野：発生学、再生医学

キーワード：エナメル芽細胞 象牙芽細胞 Amelogenin-X Dsp α 前駆細胞 tdTomato GFP 胚性幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の形成は歯上皮と神経堤由来の歯間葉との相互作用で進み、前者はエナメル質を産生するエナメル芽細胞に、後者はデンチンを産生する象牙芽細胞に分化する。これまでエナメル芽細胞に特異的に発現する遺伝子の一つである *Amelx* や象牙芽細胞に特異的に発現する遺伝子の一つである *Dspp* の遺伝子破壊マウスは、エナメル質形成不全症や象牙質形成不全症のモデルとなることが報告された。しかしながら、これらの遺伝子座に蛍光タンパクを挿入したマウスは報告されておらず、エナメル芽及び象牙芽細胞を適切に標識し、簡単に単離・同定することはできなかった。AMELX はエナメルマトリックスタンパクの 90% をしめ、DSPP は象牙質の非コラーゲン蛋白の主成分であることから、我々は *Amelx* と *Dspp* の遺伝子座に GFP 及び tdTomato を挿入した遺伝子組み換えマウスを作成することを考案し、別蛍光タンパク質で、エナメル芽細胞及び象牙芽細胞を検出・同定することを試みることにした。同時に両遺伝子組み換えマウスを交配することで、同一個体あるいは試験管内で別蛍光タンパクを指標に、エナメル産生細胞と象牙質産生細胞を検出できる方法を樹立することで、歯の分化誘導を簡単に検出する方法の開発につながるのではないかと考えた。また、胚性幹細胞株から象牙質を産生する象牙芽細胞とエナメル質を産生するエナメル芽細胞の分化誘導の報告はなかった。

2. 研究の目的

歯の発生は歯上皮と神経堤由来の歯間葉の相互作用で進み、歯上皮はエナメル芽細胞に、歯間葉は象牙芽細胞に分化する。歯では細胞系譜特異的標識及び幹細胞を用いた歯の器官再生は殆ど行なわれていない。本研究は、象牙芽細胞特異的遺伝子 dentin sialophosphoprotein (*Dspp*) 及びエナメル芽細胞特異的遺伝子 Amelogenin (*Amelx*) に焦点を置き、両遺伝子の発現を同一個体で別々の蛍光で検出できるマウスや胚性幹細胞株を用いて、蛍光を指標に象牙芽細胞とエナメル芽細胞を誘導すること、また培養により蛍光陽性の象牙芽或はエナメル芽細胞へ分化できる蛍光陰性の前駆(幹)細胞を歯髄・歯胚及び胚性幹細胞から同定、単離することである。これらの前駆(幹)細胞、特に単一化細胞を用いて歯の器官形成の培養系を確立することである。さらに、胚性幹細胞株から象牙質を産生する象牙芽細胞とエナメル質を産生するエナメル芽細胞の分化誘導系を確立することである。

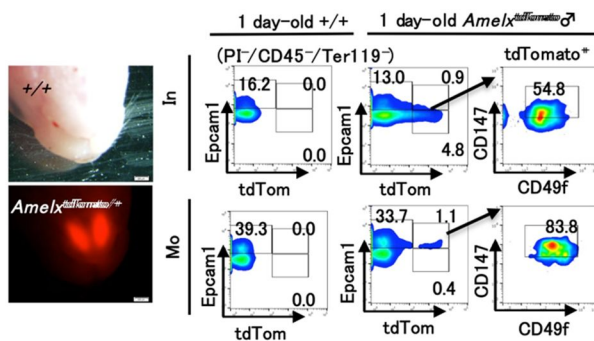
3. 研究の方法

1) 我々が樹立した *Amelx*-tdTomato マウスのエナメル芽細胞が tdTomato で標識されているかを免疫組織学的方法或いは細胞を単一化して、フローサイトメトリーにて確認する。2) 我々が樹立した *Dspp*-GFP マウスの象牙芽細胞が確かに GFP で標識されているかを免疫組織学的方法或いは細胞を単一化して、フローサイトメトリーにて確認する。3) エナメル芽細胞と象牙芽細胞を同一個体で別蛍光で検出できる *Amelx*-tdTomato ; *Dspp*-GFP 二重遺伝子組み換えマウスのエナメル芽細胞と象牙芽細胞が tdTomato 及び GFP で検出できるかを免疫組織学的方法或いはフローサイトメトリーにて確認する。4) 歯胚中の象牙芽細胞の前駆細胞を同定する目的で、象牙芽細胞に分化する前は GFP 陰性で象牙芽細胞に分化すると GFP 陽性になる細胞分画を単離し、歯胚培養にて確認する。5) 歯胚中のエナメル芽細胞の前駆細胞を同定する目的で、エナメル芽細胞に分化する前は tdTomato 陰性でエナメル芽細胞に分化すると tdTomato 陽性になる細胞分画を単離し、歯胚培養にて確認する。6) *Amelx*-tdTomato ; *Dspp*-GFP 二重遺伝子組み換えマウスから胚性幹細胞株を樹立し、試験管内で GFP 陽性の象牙芽細胞及び tdTomato 陽性のエナメル芽細胞を誘導する系を検討する。

4. 研究成果

実験 1) 我々が樹立した *Amelx*-tdTomato マウスのエナメル芽細胞が tdTomato で標識されているかを免疫組織学的方法或いはフローサイトメトリーにて確認した。図 1 に示すように、エナメル芽細胞は tdTomato 陽性で、上皮マーカーの Epcam1 陽性で CD147 や CD49f を発現した。

実験 2) 我々が樹立した *Dspp*-GFP マウスの象牙芽細胞が確かに GFP で標識されているかを免疫組織学的方法或いはフローサイトメトリーにて確認する。



Epcam1 上皮細胞マーカー
図1 tdTomatoを指標にしたエナメル芽細胞の同定と単離

図2に示すように、象牙芽細胞はGFP陽性でフローサイトメトリーにてCD45-Epcam1-分画(非血液/上皮)に存在し、CD90やintegrin a4等の細胞表面マーカー陽性であり、単離できることを明らかにした。

実験3) エナメル芽細胞と象牙芽細胞を同一個体で別蛍光で検出できる *Ame1x*-tdTomato; *Dspp*-GFP 二重遺伝子組み換えマウスのエナメル芽細胞と象牙芽細胞がtdTomato及びGFPで検出できるかを免疫組織学的方法或いは細胞を単一化してフローサイトメトリーにて確認する。

Ame1x-tdTomato; *Dspp*-GFP 二重遺伝子組み換えマウスでは確かに、エナメル芽細胞はtdTomato陽性で象牙芽細胞はGFP陽性であることがわかった(図3)。このマウスを用いれば、同一個体で別蛍光でエナメル芽細胞と象牙芽細胞を簡単に検出できる。フローサイトメトリーにて、GFP陽性細胞、tdTomato陽性細胞、少数のGFP+/tdTomato+陽性の細胞を検出することができ、上皮細胞マーカーEpcam1を用いてtdTomato+のエナメル芽細胞を分離することができる(図4)。

実験4) 歯胚中の象牙芽細胞の前駆細胞を同定する目的で、象牙芽細胞に分化する前はGFP陰性で象牙芽細胞に分化するとGFP陽性になる細胞分画を単離し、歯胚培養にて確認する(図5)。

胎生E12.5-14.5の歯間葉は*Dspp*を発現しないことから、GFP陰性間葉細胞を単離し、歯上皮と共培養し、GFP陽性の象牙芽細胞が誘導できることを歯胚培養にて確認し、陰性分画に象牙芽細胞の前駆細胞が存在することを確認した。現在、様々な細胞表面分子を用いて、分画化し、どの細胞表面因子を発現する分画が象牙芽細胞の前駆細胞を多く含むか検討中である(図6)。

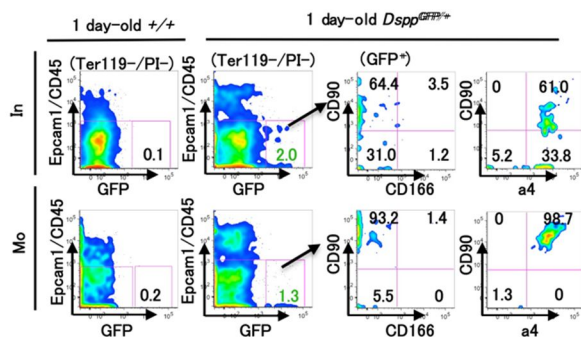


図2 GFPを指標にした象牙芽細胞の同定と単離
Epcam1 上皮細胞マーカー CD45: 血液マーカー

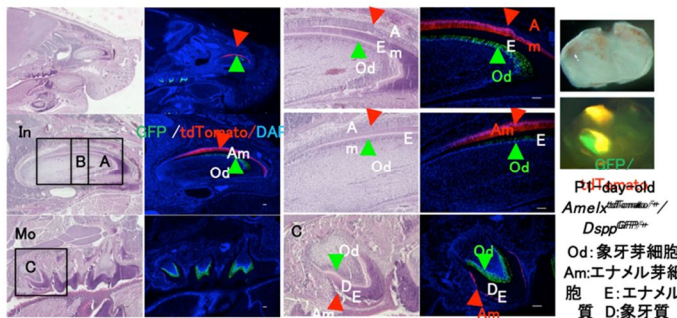


図3 象牙芽細胞とエナメル芽細胞を別蛍光で同時に検出できる3週齢の*Dspp*^{GFP/+};

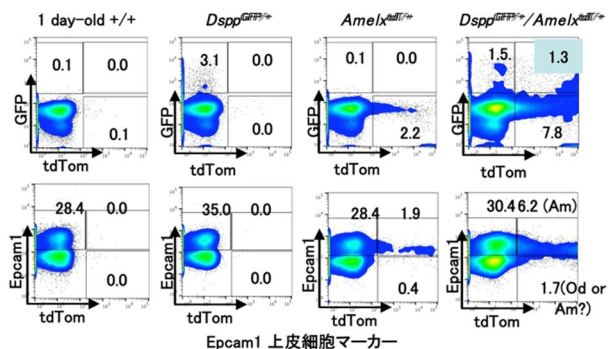


図4 *Dspp*^{GFP/+}/*Ame1x*^{GFP/+}マウスにはtdTomato+エナメル芽細胞とGFP+象牙芽細胞とGFP+/tdTomato+細胞が検出できる

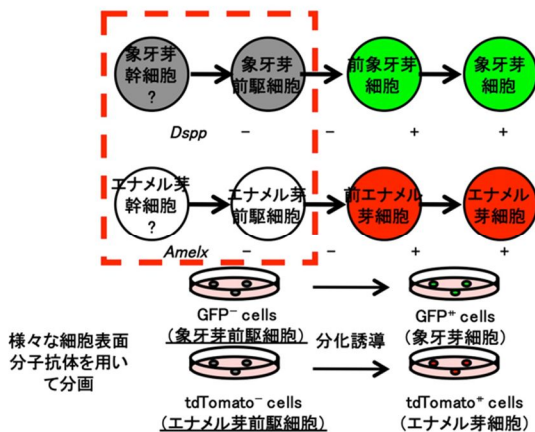


図5 象牙芽細胞前駆細胞・エナメル芽細胞前駆細胞の同定

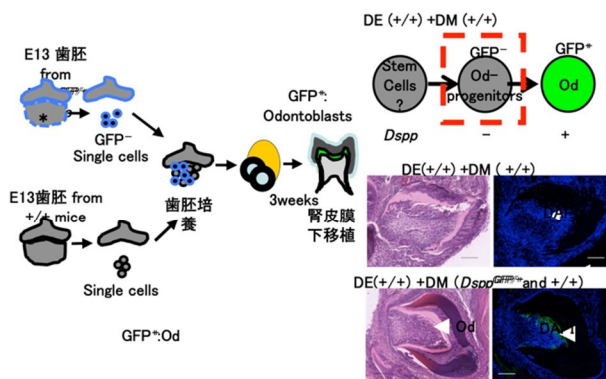


図6 E13 *Dspp*^{GFP/+} mice の歯間葉にはGFP+象牙芽細胞への分化能を有する象牙芽細胞の前駆細胞が存在する

実験5) 歯胚中のエナメル芽細胞の前駆細胞を同定する目的で、エナメル芽細胞に分化する前はtdTomato陰性でエナメル芽細胞に分化するとtdTomato陽性になる細胞分画を単離し、歯胚培養にて確認する(図5)。

胎生 E12.5-14.5 の歯上皮は *Amelx* を発現しないことから、tdTomato 陰性歯上皮細胞を単離し、歯間葉細胞と共培養し、tdTomato 陽性のエナメル芽細胞が誘導できることを歯胚培養にて確認し、tdTomato 陰性分画にエナメル芽細胞の前駆細胞が存在することを確認した。現在、様々な細胞表面分子を用いて、分画化し、どの細胞表面因子を発現する分画がエナメル芽細胞の前駆細胞を多く含むか検討中である (図7)。

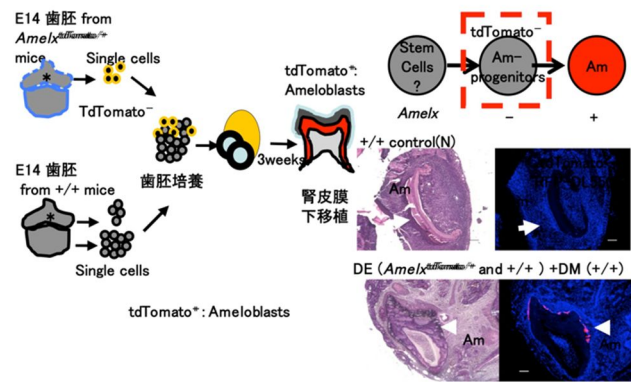


図7 E14 *Amelx*^{del/del} mice の歯上皮にはtdTomato⁺エナメル芽細胞への分化能を有するエナメル芽細胞の前駆細胞が存在する

実験6) *Amelx*-tdTomato ; *Dspp*-GFP 二重遺伝子組み換えマウスから胚性幹細胞株を樹立し、蛍光を指標に GFP 陽性の象牙芽細胞と tdTomato 陽性のエナメル芽細胞の誘導を試みているが、*Amelx* 陽性かつ *Dspp* 陽性の細胞は誘導できるものの明らかな蛍光陽性の細胞の分化誘導にはいたっていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ito Chie, Hikosaka-Kuniishi Mari, Yamazaki Hidetoshi, Yamane Toshiyuki | 4. 巻 79 |
| 2. 論文標題 Multiple cell populations generate macrophage progenitors in the early yolk sac | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences | 6. 最初と最後の頁 1-9 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-022-04203-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Hikosaka-Kuniishi Mari, Yamane Toshiyuki, Isono Kana, Tetteh Doris Narki, Yamazaki Hidetoshi | 4. 巻 243 |
| 2. 論文標題 Isolation of CD35+ follicular dendritic cells and its role in the differentiation from B cells to IgA+GL7+ cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Immunology Letters | 6. 最初と最後の頁 53~60 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imlet.2022.02.005 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Isono K, Takahashi E, Miyoshi I, Tsuneto M, Hikosaka-Kuniishi M, Yamane T, Yamazaki H. | 4. 巻 100(5) |
| 2. 論文標題 Simultaneous Fluorescent Identification of Odontoblasts and Ameloblasts. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Dent Res. | 6. 最初と最後の頁 532-541 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520974576. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mizutani K, Isono K, Matsushima Y, Okada K, Umaoka A, Iida S, Habe K, Hagimori K, Yamazaki H, Yamanaka K | 4. 巻 21(10) |
| 2. 論文標題 Inflammatory Skin-Derived Cytokines Accelerate Osteoporosis in Mice with Persistent Skin Inflammation. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci. | 6. 最初と最後の頁 3620 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103620. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 國石(彦坂) 茉里、山根利之、山崎英俊 | 4. 巻 40(12) |
| 2. 論文標題 Follicular dendritic cell によるIgEとIgA抗体の産生制御機構の解明の取り組み | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 アレルギーの臨床 (北隆館) | 6. 最初と最後の頁 1013-1016 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

[学会発表] 計17件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 松山加乃、磯野加奈、山崎英俊 |
| 2. 発表標題 修復象牙質形成における象牙芽細胞の役割 |
| 3. 学会等名 第3回Winter Dental Meeting in 津 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 磯野加奈、松山加乃、山崎英俊 |
| 2. 発表標題 エナメル質或いは象牙質形成不全を呈するマウス象牙質でのデンチン及びエナメルマトリックスタンパクの発現 |
| 3. 学会等名 第3回Winter Dental Meeting in 津 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 磯野加奈、松山加乃、山崎英俊 |
| 2. 発表標題 エナメル質形成不全を呈すAmelx-tdTomatoマウス及び象牙質形成不全を呈すDspp-GFP マウスの象牙質の性状解析 |
| 3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mari Hokosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamamne, Tetteh Doris Narki, Hidetoshi Yamazaki |
| 2. 発表標題 The role of isolated CD35+ follicular dendritic cells in the differentiation form B cells to IgA+GL7+ cells |
| 3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tetteh Doris Narki, Mari Hokosaka-Kuniishi, Hidetoshi Yamazaki |
| 2. 発表標題 Neural crest-derived mesenchymal cells support thymus regeneration after lethal irradiation. |
| 3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山崎 英俊 |
| 2. 発表標題 Amelx-tdTomato 及びDspp-GFP ノックインマウスを用いたエナメル芽細胞及び象牙芽細胞の同定と表現型解析 |
| 3. 学会等名 第69回 日本実験動物学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 國石(彦坂) 茉里、山根利之、山崎 英俊 |
| 2. 発表標題 Follicular dendritic cell-mediated enhancement of the differentiation into IgA+GL7+ cells |
| 3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山崎英俊 |
| 2. 発表標題 象牙芽細胞とエナメル芽細胞を別蛍光で標識出来るマウスによる象牙芽細胞・エナメル芽細胞の同定・単離 |
| 3. 学会等名 第57回日本口腔組織培養学会学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 磯野加奈、國石（彦坂）茉里、山崎英俊 |
| 2. 発表標題 エナメル質形成不全マウス（AmelxtdT）及び象牙質形成不全マウス（DsppGFP/GFP）を用いたエナメル質及び象牙質の構造解析の試み |
| 3. 学会等名 第2回Winter Dental Meeting in 津 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 國石（彦坂）茉里、磯野 加奈、山崎 英俊 |
| 2. 発表標題 Follicular dendritic cell によるレチノイン酸を介したIgA 抗体制御機序の解明への試み |
| 3. 学会等名 第2回Winter Dental Meeting in 津 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 磯野加奈、山崎英俊 |
| 2. 発表標題 エナメル芽細胞と象牙芽細胞を蛍光標識できるAmelx-tdTomatoノックインマウス及びDspp-GFPノックインマウスの歯のマイクロCT解析 |
| 3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 磯野加奈、國石（彦坂）茉里、山崎英俊 |
| 2. 発表標題 Amelx欠損及びDsp ^{fl} 遺伝子欠損マウスの歯のCT解析 |
| 3. 学会等名 第48回三重歯科・口腔外科学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 國石（彦坂）茉里、磯野加奈、山崎英俊 |
| 2. 発表標題 リンパ組織支持細胞Follicular dendritic cellによる粘膜免疫に関わるIgA抗体制御機構解明の試み |
| 3. 学会等名 第48回三重歯科・口腔外科学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 國石一彦坂茉里、磯野加奈、山崎英俊 |
| 2. 発表標題 粘膜免疫に関与するリンパ節支持細胞follicular dendritic cellの検出の試み |
| 3. 学会等名 第47回三重歯科・口腔外科学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Doris Narki Tetteh, Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki |
| 2. 発表標題 The role of Neural Crest-derived cells in thyme regeneration |
| 3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki |
| 2. 発表標題 Involvement of follicular dendritic cells in each LNs with IgA-production |
| 3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toshiyuki Yamane, Mari Hikosaka-Kuniishi, Hidetoshi Yamazaki |
| 2. 発表標題 Multiple cell populations generates macrophage progenitors in the early yolk sac |
| 3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>三重大学大学院医学系研究科幹細胞発生学分野 ホームページ https://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol_regener/</p> |
|--|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 磯野 加奈 (Isono Kana) (10833858) | 三重大学・医学系研究科・技術補佐員 (14101) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|