

平成 22 年 6 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791461

研究課題名（和文） Msx1 遺伝子の調節エレメントの解析

研究課題名（英文） Analysis of *cis*-regulatory elements and its ability to dedifferentiation of mature cells.

研究代表者

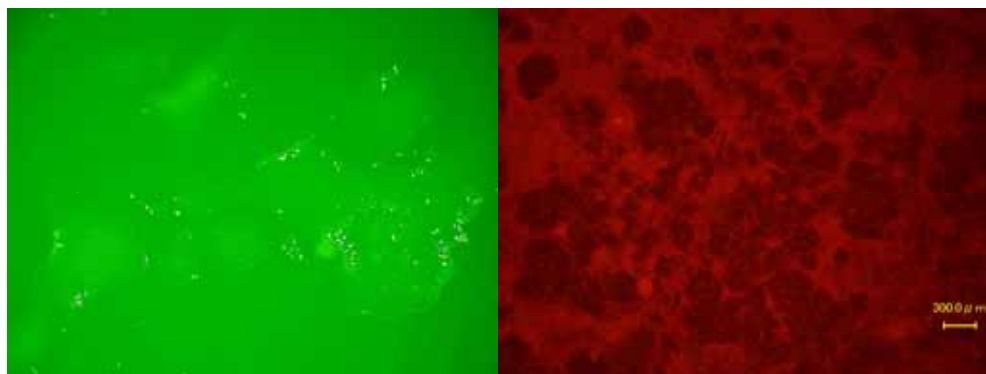
中田 秀美（NAKATA HIDEMI）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：30451967

研究成果の概要（和文）：Msx1 の *in vitro* および *in vivo* における脱分化誘導能を調べる目的で、アデノウイルスベクターに、mouse *msh-like1* (human Msx1 ホモログ) cDNA と eGFP を搭載した、Ad/*msh-eGFP* ベクターを構築し、クローンを得た。さらにコントロールベクターとして、*msh-like1*cDNA を搭載しないものも作製した。まず、最初に用いた細胞はラット白色脂肪細胞（タカラバイオ）で、脂肪細胞へと分化誘導した後、作製したアデノウイルスベクターを感染させ、脱分化が起こるかどうかを観察した（Data not shown）。しかしコントロールと比較して差はみられなかったため、C57BL6 マウスの骨髄から bone marrow cell を採取し、培養したのち、脂肪細胞分化培地を用いて脂肪細胞に分化させ、感染実験を行った。さらに感染実験後の骨髄細胞より mRNA を抽出し、脱分化のマーカである RUNX2 とハウスキーピング遺伝子である GAPDH で RT-PCR を行い、比較した。次に、マウス皮下脂肪組織より脂肪細胞を単離し、培養した後、アデノウイルスベクターによる感染実験を行った。

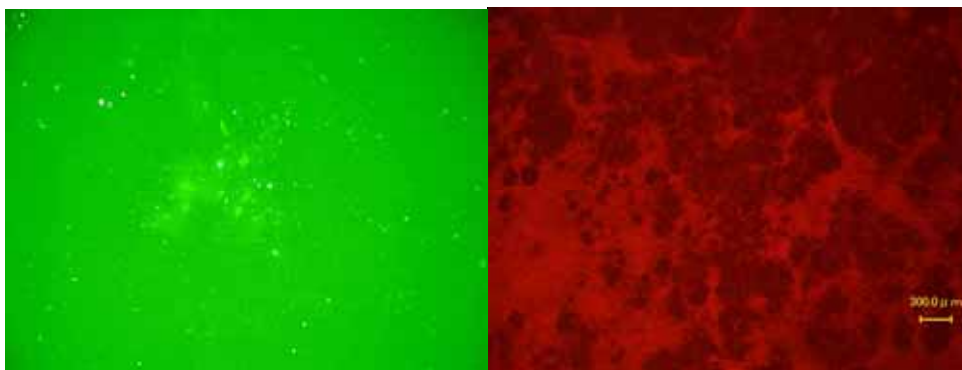
マウス BMC



Msx1 (GFP の発現)

Msx1 (oil red O 染色)

マウス BMC



Control (GFP 発現)

Control (Oil red O 染色)

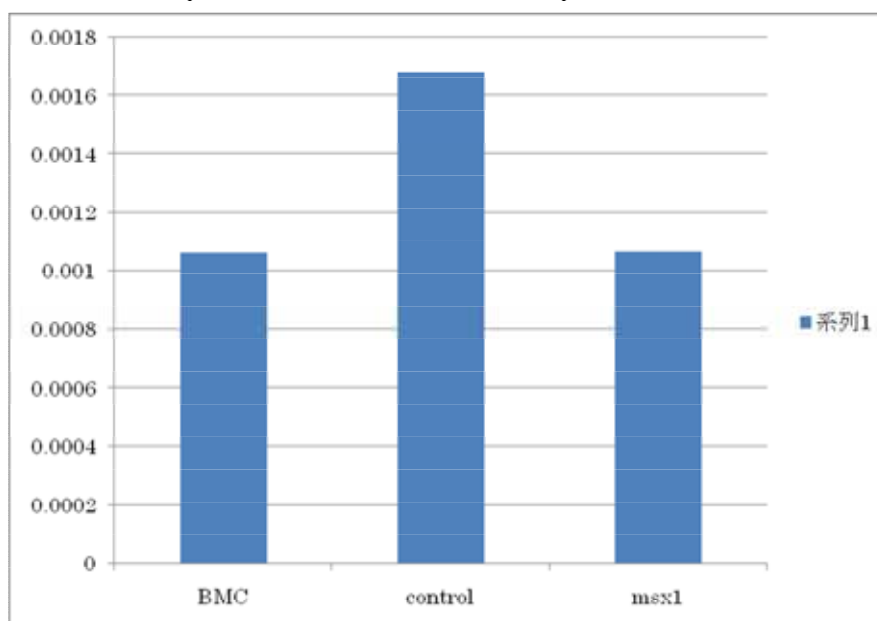
BMC より脂肪細胞へ分化誘導



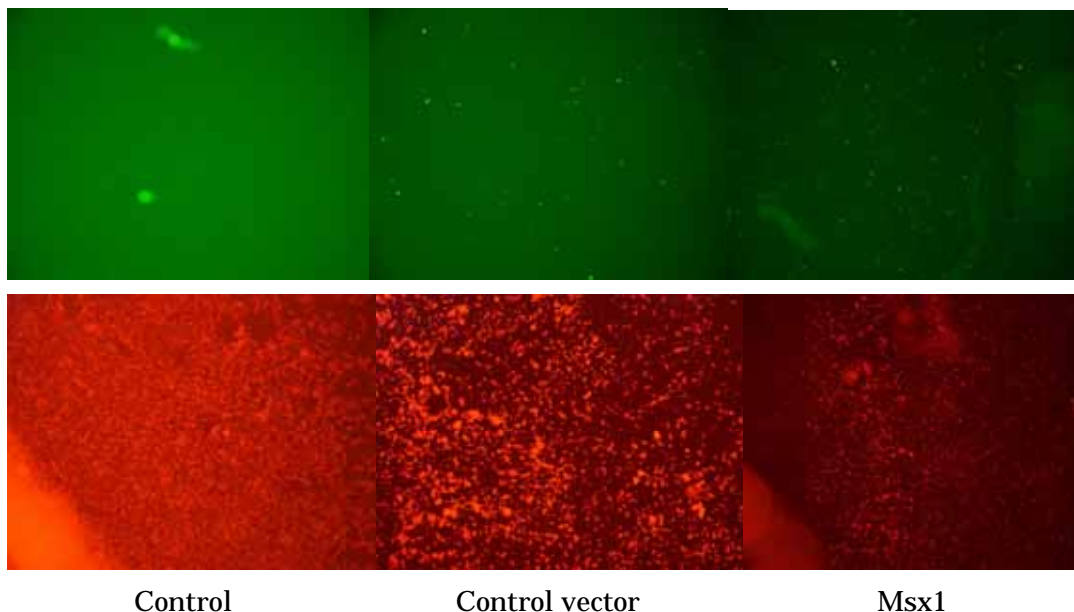
分化した脂肪細胞 (GFP 発現)

分化した脂肪細胞 (Oil red O 染色)

RT-PCR 結果 (Ratio of mRUNX2/mGAPDH)



マウス皮下脂肪組織より採取した脂肪細胞



研究成果の概要 (英文): To analyze the ability of Msx1 to dedifferentiation in vitro and in vivo, we generated eGFP reported adeno viral vector which carried mouse msh-like1 (a homolog of human Msx1) cDNA and without containing msh-like1 sequences for control vector. After infection of these viral vectors to various mature cells, we extracted mRNA and RT-PCR was performed by RUNX2 for the marker of dedifferentiation and GAPDH for house keeping gene.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野: 再生医療

科研費の分科・細目: 発生学

キーワード: 唇顎口蓋裂、MSX1

1. 研究開始当初の背景

Msx1 は器官形成の際、上皮 間葉相互作用の認められる様々な組織に発現するホメオボックス遺伝子であるが、

両生類の脱分化をおこした領域の細胞に強く発現している。このことより、Msx1 が組織再生の重要なカギとなる可能性が高い。Msx1 遺伝子の欠損マウ

スは、口蓋裂、下顎骨の低形成、歯の発生停止などをきたし、死亡する。さらに、症候群を伴わない、様々な形状の唇顎口蓋裂と歯牙欠損を保有する家系から Msx1 の exon1 に mutation の存在が確認されており、顎口蓋、歯牙の発生に Msx1 が不可欠であることが示されてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、最終的には Msx1 の時期・組織特異的発現を制御する領域、つまり調節エレメントを解明すると同時に、Msx1 の脱分化能を解析することである。Msx1 の脱分化能が明らかとなり、特定の場所に、必要なタイミングで Msx1 の発現を呼び起こすことが可能となれば、骨や軟組織、さらに歯牙などの再生を促すことも不可能ではなく、唇顎口蓋裂治療を含む再生医療に応用できる可能性が高い。

3. 研究の方法

アデノウイルスベクターに、mouse msh-like1 (Msx1 ホモログ) と GFP を組み込んだ、Ad/msh-eGFP ベクターを構築し、この発現ベクターを用いて解析した結果を踏まえ、遺伝子調節領域の解析へと繋げていく。

4. 研究成果

まず、最初に用いた細胞はラット白色脂肪細胞 (タカラバイオ) で、脂肪細胞へと分化誘導した後、作製したアデノウイルスを感染させ、脱分化が起こるかどうかを観察した。しかしコントロールと比較して差はみられなかったため、マウスの骨髄から bone marrow cell を採取し、培養したのち、脂肪細胞分化培地を用いて脂肪細胞に分化させ、感染実験を行った。さらに感染実験後の骨髄細胞より mRNA を抽出し、脱分化のマーカである RUNX2 とハウスキーピング遺伝子である GAPDH で RT-PCR を行い、比較した。次に、マウス脂肪組織より脂肪細胞を単離し、感染実験を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) Anterior tooth replacement with implants in alveolar cleft; 18th EAO Annual Scientific Meeting Monaco, 2009

2) Clinical Evaluation on Implant Treatment for CLP Patients 第 53 回口腔外

科学会総会 2008 年徳島

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 秀美 (NAKATA HIDEMI)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：30451967

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし