

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23070

研究課題名（和文）エナメル質石灰化におけるin vitro解析システムの開発

研究課題名（英文）Development of in vitro analysis system for enamel calcification

研究代表者

但野 愛実（Tadano, Manami）

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：00885535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯の発生過程においてエナメル芽細胞は中心的な役割を担っており、エナメル質形成は連続した上皮-間葉細胞の相互作用による細胞の増殖と分化により生じる。そのため、通常行われる平面培養よりも細胞間接着がより密になる三次元培養が分化に影響を与えることが示唆されている。そこで、エナメル質石灰化におけるin vitro解析システムを確立することで、簡便なエナメル芽細胞分化や石灰化評価のためのモデル作成を目指し、三次元培養下でのラット由来歯原性上皮細胞株SF2細胞の培養条件の検討を行った。その結果、エナメル質特異的な基質の誘導が生じた。従って、本培養法は人工エナメル質形成に有用な手法であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じ、三次元培養下におけるラット由来歯原性上皮細胞株SF2細胞の培養によって、エナメル質に特異的な基質の誘導が生じることが明らかとなった。これらより新たな三次元培養技術と新規分子の応用によって、より効率的なエナメル芽細胞の誘導法の新技术開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Ameloblast play a crucial role in tooth development, and enamel formation results from cell proliferation and differentiation through continuous epithelial-mesenchymal cell interactions. It is suggested that three-dimensional culture, in which cell-cell adhesion is closer than that in normal planar culture, affects differentiation. Therefore, we aimed to create a model for the evaluation of ameloblast differentiation and calcification, using rat-derived dental epithelial cell line SF2 cells in three-dimensional culture. As a result of the experiment, it was found that the secretion of enamel matrices was increased in the three-dimensional culture. Therefore, it was suggested that this culture method has been shown to be effective for efficient ameloblast differentiation.

研究分野：小児歯科

キーワード：エナメル芽細胞 歯 三次元培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の発生過程において、エナメル芽細胞は中心的な役割を担っており、エナメル質形成は連続した上皮 - 間葉細胞の相互作用による細胞の増殖と分化により生じ、組織特異的な基質タンパクの分泌やカルシウムなどイオンの共有により、整列したエナメル小柱が形成される。細胞 - 細胞間結合タンパク質である E - カドヘリンは、サービカルループの領域に多く発現しており、E - カドヘリンノックアウトマウスにおいてエナメル芽細胞が減少し、さらに、細胞間結合の一つであるギャップ結合の異常により、ヒトにおいてエナメル質形成不全を生じることが知られている。これらより、細胞間接着がエナメル芽細胞の分化に重要であることを示唆しており、通常行われる平面培養よりも細胞間接着がより密になる三次元培養が歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞分化に影響を与えることが示唆された。実際に、歯原性上皮細胞の三次元培養を行うことで、平面培養では必須であった成長因子の添加を必要とせずにアメロプラスチンやアメロジェニンなどのエナメル基質タンパク質の発現を高めることが報告されている (Tadaki M et al. Rsc Advances 2016)。しかし、その具体的なメカニズムや関連因子には依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エナメル質の石灰化における *in vitro* 解析システムを開発することで、容易にエナメル芽細胞分化や石灰化機構を解明するためのモデル作成である。

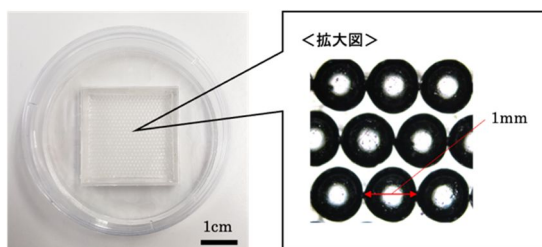
近年、再生医学の進展により、歯科領域においてもその実用化への関心は高まっている。これまで歯の再生は、人工的に歯胚を作成し、その人工歯胚を移植することで試みられてきた。しかし、この手法では、胎児由来細胞の利用による倫理的問題、大型器官を形成することが困難、などの問題が存在する。これまで、大型器官を構築する為の基本技術の開発のために、SF2 細胞をこれまでの平面培養に代わり三次元培養することで、特別な分化誘導培地を必要とせずエナメル芽細胞分化を加速化させ、最終の分化様式である石灰化の過程まで至ることを明らかにしてきた。さらに、*in vivo* と近似した環境で再現するために、細胞極性決定に関わる新たな分子スクリーニングを行い、歯胚に特異的に発現する分子を同定している (Miyazaki K et al. PLoS One 2016)。これらより、今回新たな三次元培養技術と新規分子の応用によって、より効率的なエナメル芽細胞の誘導法の構築を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、エナメル質石灰化における *in vitro* 解析システムを確立することで、簡便なエナメル芽細胞分化や石灰化を評価するためのモデル作成を目指した。

(1) 三次元培養下における SF2 細胞の培養条件の検討

これまでの研究から、三次元培養器(右図)に細胞を播種するだけで球状形態(スフェア形成)を維持することが明らかとなっている。スフェア形成のサイズによる分化への影響を評価するために、エナメル芽細胞分化マーカーであるエナメル基質タンパクを指標として、培養条件に関して検討を行った。



(2) エナメル芽細胞分化マーカーの発現解析

スフェアのサイズが確定した段階で、三次元培養を行った SF2 細胞より RNA を抽出し、Real time RT-PCR 法にて、エナメル基質タンパクの発現を解析した。また、エナメル芽細胞分化マーカーの局在をみるために免疫染色を行った。

4. 研究成果

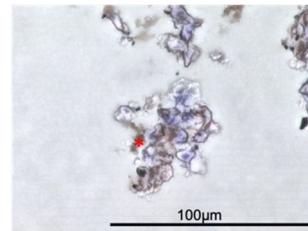
(1) 三次元培養下における SF2 細胞の培養条件の検討

三次元培養器に 1.0×10^6 cells/chip の細胞数で播種し、2 日後に Real time RT-PCR 法にてアメロプラスチンの発現量を解析したところ、発現が高い傾向を認めたため、以下の実験においては、細胞数を 1.0×10^6 cells/chip として行った。三次元培養器に 1.0×10^6 cells/chip で SF 2 細胞を播種したところ、播種後 24 時間以内にスフェアを形成した。培養 5 日目のスフェロイドの平均直径は、 $95 \pm 6 \mu\text{m}$ であった。スフェア直径の経時的変化においては、培養日数による大きな変化は認められなかった。

(2) エナメル芽細胞分化マーカーの発現解析

Real time RT-PCR 法により、エナメル芽細胞マーカーであるアメロプラスチンについて発現解析を行ったところ、平面培養と比較して発現の上昇を認めた。

また、スフェアの凍結切片に対して免疫染色を行い、三次元培養におけるマーカータンパク質の発現を解析した。その結果、すべての細胞においてアメロプラスチンの発現が認められた。今後は、他のエナメル芽細胞分化マーカーについても更なる解析を進めていく予定である。



*：アメロプラスチン

また、培養細胞は、細胞の機能を調節する様々なタンパク質を培養液中に分泌する。エナメル芽細胞分化における歯原性上皮細胞由来の要因には複数の因子が考えられる。直接因子としては、細胞間結合分子や接着因子、エナメル基質タンパク、間接因子としては、歯原性上皮細胞から培養液中に分泌された増殖因子やそれらの活性調節因子、培養液の pH 等が考えられる。より効率的なエナメル芽細胞分化のため、エナメル芽細胞のマーカー遺伝子の発現変化を解析する。

近年、再生医学の進展により、歯科領域においても再生医療が実用化しつつあるが、生体内においても特殊な機能を有するエナメル芽細胞への分化誘導法は未だ確立されていない。これを実現化するためには、エナメル芽細胞の分化や石灰化機構の解明と、この過程に関わる分子の機能を明らかにしていく必要があるといえる。これらより、解析モデルを確立することで、これまで培養に長い時間を要していた歯の再生において、その短縮化および効率化への貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------