

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 18 日現在

機関番号： 14101  
 研究種目： 基盤研究（B）  
 研究期間： 2009 ～ 2012  
 課題番号： 21390489  
 研究課題名（和文） 神経堤と中胚葉を標識できるマウス歯髄幹細胞及び胚性幹細胞を用いた硬組織再生  
 研究課題名（英文） Hard tissue regeneration using dental mesenchymal stem cells and embryonic stem cells that enabled us to trace neural crest cells and mesodermal cells  
 研究代表者  
 山崎 英俊（YAMAZAKI HIDETOSHI）  
 三重大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号： 00283987

研究成果の概要（和文）：神経堤或は中胚葉由来細胞を蛍光標識できるマウスから胚性幹細胞株を樹立した。続いて樹立した胚性幹細胞より蛍光陽性細胞の誘導条件を検討し、神経堤由来細胞である色素細胞を指標に蛍光陽性細胞が確かに神経堤細胞を含むことを確認した。また、試験管内でこれらの蛍光陽性の神経堤細胞を神経や色素細胞のみならず、骨、脂肪を含む間葉系細胞に誘導した。さらに、歯の象牙芽細胞の分化誘導の検出系の確立を目指し、象牙芽細胞に特異的な遺伝子である *Dspp* の遺伝子座に蛍光蛋白 GFP を挿入した相同組換え胚性幹細胞株を樹立し、多数のキメラマウスを得た。この胚性幹細胞を神経堤に分化誘導後、腎皮膜下に移植し、蛍光陽性の細胞が誘導された。現在、この胚性幹細胞から GFP 陽性の象牙芽細胞の分化誘導を行っている。

研究成果の概要（英文）：Using transgenic mice that enabled us to trace NC cells and mesodermal cells as YFP<sup>+</sup> cells, respectively, we established ES cell lines to investigate whether NC cells or mesodermal cells were generated from ESCs in the culture. We found that NC-derived melanocytes were efficiently generated from NC-derived YFP<sup>+</sup> cells. The NC-derived YFP<sup>+</sup> cells also expressed strongly NC-associated genes. We also found that NC-derived YFP<sup>+</sup> cells differentiated into not only melanocytes, but also neurons, adipocytes, and osteoblasts. Furthermore, to detect the differentiation of odontoblasts *in vivo* and *in vitro*, we made *Dspp* Knock-In ES (*Dspp*-KI ES) cell lines by targeting vector that inserted GFP into *Dspp* gene. Then, *Dspp*-KI ES cells were injected into blastocysts, and large numbers of chimera mice were obtained. *Dspp*-KI ES-derived cells cultured for 6 days also were transplanted into kidney capsule, and 4 weeks after YFP<sup>+</sup> cells were detected in the transplanted tissues. We further try to differentiate these ESCs into odontoblasts *in vitro* through NC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2012 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：幹細胞学・再生医学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）・神経堤細胞・間葉細胞・象牙芽細胞・胚性幹細胞・Dsp 遺伝子・中胚葉

## 1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞は、脊椎動物の発生初期に神経管背側部より出現する細胞集団で、特に頭部神経堤細胞は骨、軟骨や象牙芽細胞等の間葉系細胞への分化能を有し、脊椎動物のボディプランを特徴づける重要な細胞である。また、骨や軟骨等の間葉系細胞は中胚葉及び神経堤細胞に由来し、頭部間葉は主に神経堤に、体幹部間葉は、主に中胚葉に由来すると考えられているが、区別は難しく、詳細な由来は殆ど分かっていない。これまで、大隅らによる蛍光色素 DiI と全胚培養法を用いての神経堤細胞の標識法では、歯間葉は中脳に由来する神経堤細胞が寄与することが報告された。しかし、神経堤細胞以外の細胞が歯の器官形成に関与するかは明らかではない。

最近、神経堤細胞に特異的に遺伝子発現を誘導出来る制御領域の下流に Cre を連結したマウスと LoxP 配列を持つレポーター遺伝子を組み合わせることで、神経堤由来細胞を標識できるようになった。我々も、これらのマウスを用いて、歯の間葉には骨や軟骨や象牙芽細胞への分化能を持つ細胞が多数存在し、それらが神経堤に由来する細胞のみならず神経堤細胞以外に由来する可能性を示した。そこで、中胚葉由来細胞を標識できるマウスを用いて、歯胚や歯髄の間葉には中胚葉に由来する細胞も寄与している事を明らかにした。現在、ヒト歯髄及び歯根膜周囲に幹細胞が存在するとの報告があるが、これらの幹細胞の由来はよくわかっていない。そこで、神経堤及び中胚葉に由来する間葉系細胞を分取し、歯胚や歯髄の間葉系幹細胞の由来を明らかにし、その遺伝子発現や分化能、性状を明らかにすることで、歯を用いた再生医療を実現するための基礎研究とすることが目的である。

幹細胞は胚性幹細胞と組織幹細胞に分かれる。我々は世界に先駆けてマウス胚性幹細胞から破骨細胞や神経堤細胞系譜の色素細胞の分化誘導系を確立した。また、試験管内及び生体内での簡便な象牙芽細胞の検出系を確立するために、象牙芽細胞に特異的に発現する Dsp 遺伝子の制御領域を単離し、その下流に LacZ 遺伝子を連結したマウスを作製した。

現在、本研究の前段階として神経堤細胞と中胚葉に由来する細胞を蛍光標識できる胚性細胞株を作製中である。これらの胚

性幹細胞株を用いて、試験管内で象牙芽細胞を始めとする硬組織の分化誘導系の確立と、中胚葉と神経堤に由来する間葉の相違点を明らかにすることが本研究の大きな目標である。

## 2. 研究の目的

間葉細胞は主に神経堤と中胚葉に由来すると考えられている。本研究の目的は、歯や頭部の器官形成に神経堤由来細胞が寄与していると言われるが、中胚葉由来間葉は寄与しているのか、また象牙芽細胞が神経堤細胞にのみ由来するかを、神経堤細胞と象牙芽細胞を別々に蛍光標識した胚性幹細胞あるいは生体内の神経堤細胞を用いて検討することである。これまで、胚性幹細胞や未分化な神経堤細胞から象牙芽細胞の分化誘導系は報告されていない。そこで、象牙芽細胞に分化決定した細胞を蛍光で検出できる系を用いて、未熟な細胞から象牙芽細胞の分化決定機構を明らかにし、また生体内の象牙芽細胞への分化能を持つ細胞を同定することである。

## 3. 研究の方法

本研究では、1) 神経堤由来細胞及び中胚葉に由来する細胞を蛍光標識できるマウスを用いて、歯の間葉細胞の由来をフローサイトメトリーや組織切片を用いて解析する。2) 象牙芽細胞に特異的に発現する Dsp 遺伝子の遺伝子座に蛍光遺伝子 GFP を挿入した組換えベクターを作製し、これを用いて相同組換え胚性幹細胞株を樹立する。3) 樹立された胚性幹細胞株からブラストシストインジェクション法にてキメラマウスを作製し、生体内における象牙芽細胞の検出を行う。4) 1) の神経堤由来細胞を別の蛍光で標識できるマウスと交配し、象牙芽細胞が神経堤細胞のみに由来するかを検討する。5) 1) の神経堤細胞と中胚葉由来細胞を蛍光標識できる胚性幹細胞株を樹立し、試験管内で神経堤細胞が誘導できる条件を検討し、また神経のみならず間葉系細胞への分化誘導系を確立する。6) 象牙芽細胞を蛍光標識できる胚性幹細胞から、まずは神経堤細胞を分化誘導し、蛍光陽性の象牙芽細胞を誘導できる条件を試験管或は腎皮膜下移植法にて検討する。

## 4. 研究成果

(1) 歯胚（歯髄）に存在する中胚葉或いは神経堤由来細胞の有無をフローサイトメトリーで調べたところ、90%以上が神経堤に由来し、主に PDGFR を発現し、一方中胚葉由来間葉は、数%で主に血管に寄与していた。さらに、神経堤或は中胚葉由来細胞を細胞分取

装置を用いて単離し、遺伝子発現を検討したところ、歯に存在する神経堤由来細胞は p75NGFR や Ap2, Sox10 等の神経堤由来細胞に関わる転写因子を発現し、中胚葉由来細胞は Brachyury を発現し、遺伝子発現が異なり、別の細胞集団であることが確認できた

(2) 試験管内で胚性幹細胞から神経堤或は中胚葉由来の間葉細胞の誘導の有無を検出する目的で、マウスから神経堤或は中胚葉由来細胞の分化誘導をYFPで標識できる胚性幹細胞株を樹立した。この胚性幹細胞からYFPを指標に神経堤或は中胚葉系譜の細胞を誘導する条件を確立した。

(3) ①これまで、我々は、胚性幹細胞から神経堤細胞系譜として知られる色素細胞の分化誘導系を確立しているため、まずYFP陽性細胞を単離し、色素細胞を誘導した。さらに色素細胞がYFP陽性細胞からのみ誘導されることを確認したので、少なくとも生体内同様に神経堤細胞は本培養系で誘導され、YFP陽性細胞に神経堤細胞は含まれていることが確認できた。②さらに、中胚葉由来細胞を標識できる胚性幹細胞から、YFP陽性の血液細胞を分化誘導することも確認した。③また、神経堤由来細胞をYFPで標識できる胚性幹細胞からYFP陽性の色素細胞のみならず神経細胞、骨芽細胞、脂肪細胞等の間葉系細胞を誘導する系を確立した。その際、フィーダーは間葉系由来で、骨や脂肪への分化能を持ち、区別が難しいことから、放射線照射後の支持細胞の使用、或は、フィーダー無しの条件での培養を確立した。さらに本培養系を発展させて、無血清、無フィーダーの条件で、効率に神経堤細胞を誘導する系を確立し、これらの細胞から確かに色素細胞のみならず間葉系細胞への分化能を有する神経堤細胞が誘導されていることを明らかにした。

(4) ①神経堤細胞から神経堤細胞系譜である象牙芽細胞の誘導の有無を検出する目的で、象牙芽細胞に特異的に発現すると考えられている dentin sialophosphoprotein (Dsp) の遺伝子の開始コドンの直下に蛍光蛋白である GFP を挿入した遺伝子ベクターを作製した。②本ベクターを用いて相同組み換え胚性幹細胞株を得た。③現在まで、ブラストシストインジェクション法にて多数のキメラマウスが出生したが、生殖キメラマウスの誕生には至っていない。④さらに、我々は、神経堤細胞から象牙芽細胞への分化系を確認する目的で、神経堤細胞と象牙芽細胞を

別々の蛍光標識できるマウスの準備も行った。キメラマウスができ次第、交配し、CFP陽性の神経堤由来細胞を単離し、GFP陽性の象牙芽細胞に分化できるか検討する。

(5) これまで、胚性幹細胞を神経堤細胞へと試験管内で誘導し、様々な支持細胞上で象牙芽細胞への分化を試みたが残念ながらGFP陽性の細胞は誘導できていない。しかし、神経堤細胞に分化誘導させた培養6日の胚性幹細胞をコラーゲンゲルと混ぜて腎皮膜下に移植することで、GFP陽性の組織を誘導することに成功した。試験管内での誘導には、歯上皮或は上皮から分泌される因子の存在が重要であると考え、現在、E12, E13日齢マウスの歯胚の上皮細胞を単離し、効率的に増殖させる条件を確立したので、歯髄の神経堤細胞や誘導された神経堤細胞と共培養し、GFP陽性の象牙芽細胞を誘導する条件の確立を目指して培養をしている。

今後は、本研究課題で立案した、象牙芽細胞を蛍光標識できるマウスの作製と試験管内及び生体内で神経堤細胞から象牙芽細胞への運命決定機構を解明し、さらに未だに明らかにされていない象牙芽細胞への分化能を持つ様々な細胞を同定したいと考えている。

## 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5件)

①Origins and properties of dental, thymic, and bone marrow mesenchymal cells and their stem cells. Komada Y, Yamane T, Kadota D, Isono K, Takakura N, Hayashi S, Yamazaki H. PLoS One. (査読有) 7(11) e46346. doi:10.1371/journal.pone.0046436. (2012)

②Methods for investigation of osteoclastogenesis using mouse embryonic stem cells. Tsuneto M, Yamane T, Hayashi S. Methods Mol Biol. (査読有) 690:239-253. (2011)

③医療に関連するトピックス 再生医療と幹細胞 山崎英俊 理学療法ジャーナル 医学書院 (査読無) Vol. 44.No8 :682 (2010)

④Expression of AA4.1 marks lymphohematopoietic progenitors in early

mouse development. Yamane T, Hosen N, Yamazaki H, Weissman IL. Proc Natl Acad Sci U S A. (査読有) 106(22): 8953-58 (2009)

⑤ Comparison of osteoclast precursors in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis and osteoporosis patients. Nose M, Yamazaki H, Hagino H, Morio Y, Hayashi S, Teshima R. J Bone Miner Metab. (査読有) 27(1):57-65 (2009)

[学会発表] (計 20 件)

① Contribution of Neural-Crest derived Cells and Mesodermal Cells to the Mouse Bone-marrow and Thymic Hemato-lymphopoiesis. 角熊直樹、松本千晶、山根利之、山崎英俊. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日 神戸

② Contribution of neural crest and mesodermal cells to the mouse bone-marrow and thymic Hematopoiesis. 角熊直樹、松本千晶、山根利之、山崎英俊 第74回日本血液学会総会 2012年10月19-20日 京都

③ Cell fate regulation of the common primitive-definitive hematopoietic progenitors. 山根利之、鷺野亜矢、山崎英俊 第74回日本血液学会総会 2012年10月19-20日 京都

④ 神経堤或は中胚葉由来間葉細胞の欠損による造血細胞の異常とストレス反応 松本千晶、角熊直樹、山根利之、山崎英俊 第81回 東海動物実験研究会 2012年07月21日 津

⑤ マウスES細胞からの神経堤細胞の誘導 栗谷健志、山根利之、山崎英俊 第81回 東海動物実験研究会 2012年07月21日 津

⑥ Characterization of the earliest hematolymphoid progenitors in mouse ontogeny. 山根利之、鷺野亜矢、山崎英俊 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14日 名古屋

⑦ 様々な器官における間葉細胞の由来と神経堤細胞の間葉系幹細胞としての可能性 山崎英俊 (招待講演) 第53回歯科基礎医学会学術大会 サテライトシンポジウム8 「神経堤細胞の未知なる可能性：個体発生から再生医療へ」 2011年9月30日 岐阜

⑧ マウス血液細胞発生過程における因子依存性 鷺野亜矢、重岡稔章、山崎英俊、山根利之 第33回日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸

⑨ Involvement of p38a in blood cells in the regulation of obesity and blood glucose level Sadatugu Ookuma, Takahiro Fujikawa, Kazuto Sugimura, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki, Kinya Otsu, Masato Ogata 第33回日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸

⑩ 神経堤細胞特異的ALK3シグナルノックダウンによる顔面形態形成異常の解析 齊藤浩充、山崎英俊、鈴木昇 第33回日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸

⑪ 歯、胸腺、骨髄の間葉系幹細胞の起源と性状の解析 山崎英俊、磯野加奈、重岡稔章、山根利之 第33回日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸

⑫ Developmental origin of the earliest hematolymphoid progenitors. Yamane Toshiyuki, Aya Washino, Yamazaki Hidetoshi. 第72回日本血液学会総会 日本血液学会2010年9月24日 横浜

⑬ Lymphoid lineage potential and developmental origin of the earliest hematopoietic progenitors in mice. Toshiyuki Yamane, Aya Washino, and Hidetoshi Yamazaki. 14<sup>th</sup> International congress of Immunology, Kobe, Japan, 23 August 2010年

⑭ Contribution of neural crest-derived cells and mesoderm-derived cells to the thymic and bone marrow mesenchyme from fetus to adult. Hidetoshi Yamazaki, Toshiyuki Yamane. 14<sup>th</sup> International

congress of Immunology, Kobe, Japan, 23 August 2010年

⑮ Developmental origin of the earliest mouse hematolymphoid progenitors. Yamane Toshiyuki, Yamazaki Hidetoshi. 8<sup>th</sup> International Society for Stem cells Research ISSCR. San Francisco, CA USA. 16 Jun, 2010

⑯ 歯胚（歯髄）の間葉系細胞の由来とその性質 山崎英俊、山根利之 第32回日本分子生物学会 2009年12月9-12日 横浜

⑰ Developmental origin of the earliest definitive hematopoietic progenitors. Yamane Toshiyuki, Yamazaki Hidetoshi 第39回日本免疫学会学術集会 2009年12月2-4日 大阪

⑱ Identification and characterization of the earliest hematolymphoid progenitors in mouse development. Yamane Toshiyuki, Yamazaki Hidetoshi 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月23-25日 京都

⑲ マウス胚性幹細胞から神経堤様細胞の分化誘導 山崎英俊 第51回日本歯科基礎医学学術大会2009年9月9-11日 新潟

⑳ 神経堤細胞と器官形成 第11回日本口腔顔面顎外傷学会(招待講演) 山崎英俊 2009年7月18日 札幌

㉑ Induction of neural crest-like cells from murine embryonic stem cells. Yamazaki Hidetoshi, Miyazaki Katsuyuki, Yamane Toshiyuki 第7回 国際幹細胞学会年次集会 2009年 8-11, July, スペイン (バルセロナ)

[その他]

ホームページ等

[http://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol\\_regener/](http://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol_regener/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 英俊 (YAMAZAKI HIDETOSHI)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号： 00283987

### (2) 研究分担者

山根 利之 (YAMANE TOSHIYUKI)  
三重大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号： 30452220

川添 真史郎 (KAWAZOE SHINJIRO)  
三重大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号： 30467360