

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 20 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659346

研究課題名（和文） マウス歯胚によるヒト歯硬組織再生に関する研究

研究課題名（英文） Human tooth hard tissue regeneration by mouse tooth germ

研究代表者

坂上 竜資（RYUJI SAKAGAMI）

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50215612

研究成果の概要（和文）：齧歯類では恒常的に切歯が伸び続けるため、切歯歯胚には高い分化能と再生能がある。本研究ではこの細胞をヒトエナメル質の再生のソースとして活用することの可能性を探索した。まずトランスクリプトーム解析により若年マウスと老齢マウスの歯胚の遺伝子発現を調べ、次に免疫組織染色と RT-PCR 検査により Sox2、Oct4 などの発現を調べた。さらに、GFP 発現マウスの歯根尖細胞をワイルドタイプマウスの腎臓皮下に移植することにより、歯の構造を伴う硬組織の形成を観察した。現在は細胞をさらに効率よく収集する方法を開発中である。

研究成果の概要（英文）：Rodents have continuously growing incisors, which tooth germ might be used as a source for enamel regeneration because of its high differentiation and regeneration abilities. In this study, transcriptome analysis was first performed to evaluate the young and old mice tooth germ's genomic expression, then Sox2 and Oct4 expressions were evaluated immunohistologically and by RT-PCR. The cells derived from the apex of the incisors of GFP mice were transplanted into the subepithelial tissue of kidney, and hard tissue formation with tooth structure was observed. The method for efficiently collecting the cell source is now under investigation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	0	1,200,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：再生医療、エナメル質、歯胚

1. 研究開始当初の背景

歯科臨床における齶蝕治療法は、初期齶蝕で実質欠損を伴わなければ再石灰化を促し、実質欠損をとまなう場合には接着性レジン修復を行うことが多い。近年の接着技術の向上は目覚ましいものがあるものの歯質の欠損を人工材料に置き換えるよりは、天然成分

の構造に戻す方が好ましい症例も多いと考えられる。国内外において、エナメル欠損部に対して再生療法を試みるとするアイデアが散見されるが、いずれも宿主自身の細胞使用を前提としている。iPS 細胞の出現により細胞の確保は一步前進したかに見えるが、iPS 細胞を活性の高いエナメル芽細胞に分化

させることができるかどうかは未だ未知数である。そこでマウスの歯胚細胞に着目し、これを応用して硬組織を再生するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、齶蝕・咬耗・摩耗などによるエナメル質実質欠損に対して、歯胚中の未分化細胞を用いた再生療法を創造することを最終的な目的とする。マウスなどの齶歯類は恒常的に切歯が伸びるので、その歯胚には高い分化能と再生能があり、歯髄組織から離れた咬合面であってもエナメルを形成できる可能性がある。

(1) 本研究の第1の目的は、歯と歯周組織に存在する細胞から発現する mRNA を解析することによって、組織におけるトランスクリプトームを理解し、歯と歯周組織の再生に役立つ知見を得ようとするものである。さらに若年マウスと老齢マウス(生後2年)の下顎切歯根尖部歯胚、歯髄、エナメル質、口蓋、骨の各部位における遺伝子発現状況を比較検討する。特に、歯髄と切歯根尖部歯胚における分化再生能の指標としての遺伝子の発現状態のデータマイニングを行う。

(2) 第2の目的は、歯の再生を司る幹細胞の位置と動態を、胎生から出生後に至るマウスの歯胚形成過程を HE 染色にて観察するとともに、Sox2、Oct4 の発現を免疫染色することによって追跡することである。さらに、切歯根尖部歯胚から mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて sox2 の発現をみる。

(3) 第3の目的は、歯胚細胞の生体内における異所性の硬組織形成能の評価と評価方法の確立である。生後2日齢 GFP マウスの下顎切歯歯胚を、生後4週齢ワイルドタイプマウス腎臓皮下に移植し4週後にサクリフェイスする。その後、マイクロ CT 撮影を併用して異所性の硬組織再生能と歯の発生過程の観察をエックス線学的、病理組織学的に行う。

(4) 第4の目的は、硬組織再生のための細胞株の樹立の試みである。生後2日齢マウスから下顎切歯サービカルループの細胞塊を取り出し、初期培養を行う。この際、増殖した細胞を細胞シート工学を応用して上皮組織と間葉系組織に分けて、2つの組織の相互作用を *in vitro* にて観察するとともに、さらに生体に戻して観察する。現在も実験手技の確立に向けて取り組んでいる。

3. 研究の方法

本研究では、4つの動物実験を行った。それぞれの実験については、福岡歯科大学動物実験指針に則り、大学からの研究承認を得た後に行った。

(1) 実験1 成体および老齢マウスを用い

た歯胚のトランスクリプトーム解析

実験には生後10週の C57BL/6 マウス12匹および生後2年の老齢マウス8匹を用いた。ドライアイスを用いて酸欠状態にて安楽死させた後、20倍の実体顕微鏡下で手早くサンプルを採取した。サンプル採取部位は、生後10週マウスでは下顎前歯エナメル側5部位、根尖部10部位、歯髄5部位、口蓋粘膜4部位、大腿骨骨髄8部位とした。根尖部以外のサンプルはそれぞれを1つのチューブにまとめ、根尖部から採取したサンプルは、5部位ずつ2つのチューブに分けた。老齢マウスでは、下顎前歯エナメル側3部位、根尖部4部位、歯髄3部位、口蓋粘膜2部位、大腿骨骨髄3部位、歯根膜3部位とし、それぞれを1つのチューブにまとめた。全ての操作は冷却下で行い、Buffer RLT Plus (Qiagen 社、RNeasy Mini Plus Kit) にβ-メルカプトエタノールを加えたチューブに採取後、ボルテックスミキサーにてホモジェナイズし、急速冷凍を行った。

Qiagen 社、RNeasy Mini Plus Kit にて RNA 抽出後、Agilent 社の Bioanalyzer を用いて電気泳動を行い、濃度測定を行った。RNA 量が最低1500ng あるのを確認した後、IVT (*in vitro* T7 RNA polymerase) にて増幅し、Streptavidin-Cy3 を用いて標識を行い、cRNA の電気泳動、ハイブリダイゼーション、スキャンを行った。マイクロアレイの蛍光シグナルから、遺伝子発現データを抽出して数値化し、個々のアレイから構成されるグループの基本情報を得た。

[マイクロアレイ] マイクロアレイ解析には Illumina 社の BeadArray (feature: Mouse-6_V1.1) を使用した。このアレイは Glass slide and silicone ware に Amino-Silane 処理をしたもので、約46000の遺伝子が解析可能であった。reporter は single strand の合成オリゴであり、ビーズと共有結合している。1つのプローブごとに約30のビーズから構成され、3種類のコントロール(ノーマライゼーション用、ネガティブ用、ポジティブ用)を用意した。

[抽出およびラベル化法] RNA の増幅およびラベルには、Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (http://www.ambion.com/techlib/prot/fm_IL1791.pdf) を使用した。ハイブリダイゼーションには Illumina Gene Expression system Hyb E1 and Block Buffer kit、wash には Wash E1BC Buffer kit and High Temp Wash Buffer kit を使用した。ハイブリダイゼーションおよびスキャンに使用した機器は、BeadStation 500GX-WG system (Illumina) である。Staining には Streptavidin-Cy3 Amersham PA43001 を使用した。

[データ測定方法とデータ処理条件]

BeadStation 500GX-WG system (Illumina)を用いてスキャンした後、ソフトウェア BeadStudio (Illumina)を用いて画像データごとの完全な数値化データ出力した。データのノーマライゼーション

(<http://www.mged.org/normalization>)を行った後、データマイニングを行った。

[データマイニング法] ソフトウェア GeneViewer (Moritex) を用いて遺伝子発現解析結果データのグラフ表示、条件抽出、遺伝子名比較などを行った。各サンプル間での遺伝子発現強度の違いを、ノーマライゼーション後の差分を計算することで算定した。さらに幹細胞に発現が認められる遺伝子群の発現強度を検索した。

(2) 実験2 Sox2 および Oct4 に関する免疫組織学的観察および mRNA の解析

C57BL/6 の妊娠マウスを購入し、妊娠 15 日、17 日、19 日にてイソフルランの過麻酔にて安楽死させた後、胎仔を取り出した。また生後 2 日、生後 4 日のマウスを同様に安楽死させ、組織を採取後、直ちに 10%ホルマリン緩衝液に浸漬、通法にしたがって切片を作成後、ヘマトキシリンで 10 分、エオジンで 5 分染色後、封入し観察した。

免疫染色では、ウサギポリクローナル抗 Sox2 抗体 (1:50 STEMGENT) とウサギポリクローナル抗 Oct4 抗体 (1:300 STEMGENT) を 1 次抗体として 8 時間作用させた後、ヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO (R) (ニチレイバイオサイエンス) を用いて発色させた。

さらに、切歯根尖部歯胚から mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて sox2 の発現をみた。sox2 検出用のプライマー配列は

gatgcacaactcggagatca と

cgctcgccatgctgttcccg とし、oct4(mouse) 用のプライマー配列は

gagtggaaagcaactcagagggaac と

tctccgatttgcatactcctgaag とした。

(3) 実験3 腎臓への in vivo 移植実験

細胞供与用のホストとして、生後 2 日齢の C57BL/6-Tg (CAG EGFP) 8 匹、受容側にはワイルドタイプの C57BL/6 マウス 8 匹を用いた。C57BL/6-Tg マウスをイソフルランによる過麻酔にて安楽死させた後に組織をすみやかに取り出し、4 週齢の C57BL/6 マウスの腎臓皮膜下に移植した。移植手術は、イソフルランによる麻酔下にて背側からメスとハサミを用いて腎臓を剖出し、皮膜下に組織を移植後、腹膜縫合と皮膚縫合を吸収性の糸を用いて行った。術後 4 週まで経過を観察し、イソフルラン過麻酔により安楽死後に腎臓を取り出し 10%ホルマリン固定した。その後、マイクロ X 線 CT スキャン (Skyscan1176®) にて 18 μ m のスライスで腎臓をスキャンし、硬組織の構造を 3 次元的に判定した。

(4) 実験4 幹細胞の分離培養の試み

生後 2 日齢マウスから下顎切歯サービカルループの細胞塊を取り出し、初期培養を行った。細胞の採取にはタイプ I コラーゲンコートした 35 mm dish (イワキ社製) を用い、5%FBS 入 α -MEM にて培養した。3 日毎に培地交換を行い 6 週後まで観察した。

4. 研究成果

(1) 結果1 成体および老齢マウスを用いた歯胚のトランスクリプトーム解析

まずサンプルからのデータ収集の経過を示す。RNA の抽出により全てのサンプルで 1500ng 以上の RNA 量を確認することができた。ノーマライゼーション後に 0.8 以上数値を示す遺伝子は合計で 33121 遺伝子であった。これを抽出し、X 軸と Y 軸にそれぞれのサンプルを取り、生データを比較した (図 1)。その結果、根尖の 2 サンプル、および歯髄の間には似た発現パターンを確認した。

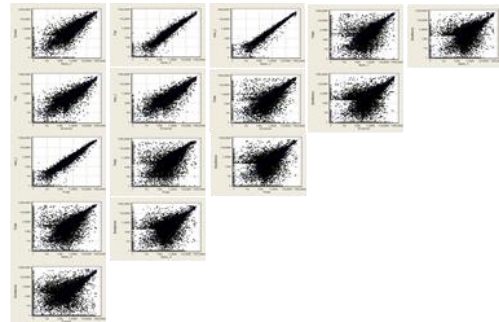


図 1 閾値以上のデータの発現パターンの比較

幹細胞に特徴的とされる Fbx15 の発現は、根尖、歯髄、口蓋にて認められた。また幹細胞の恒常性維持に重要と考えられている遺伝子 Nanog の発現を歯髄にて確認した。

特徴的な例として、エナメル質側の組織からはエナメル芽細胞由来の既知の遺伝子 Odam など認めるなど組織特異的な遺伝子発現を確認した。さらに役割のまだ分かっていない多くの未知の遺伝子の発現を認めた。

また幹細胞の恒常性維持に重要と考えられている遺伝子 Nanog の発現を若年のみならず老年マウスの歯髄においても確認することができた。しかし根尖における Sox2 の発現は若年マウスでは高値であったものの、老年マウスでは低値を示していた。

(2) 結果2 Sox2 および Oct4 に関する免疫組織学的観察および mRNA の解析

胎生期および生後マウスにおいて Sox2 は口腔粘膜上皮や歯胚に発現していた (図 2)。

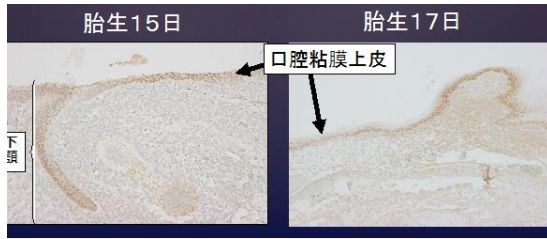


図2 胎生期における Sox2 発現

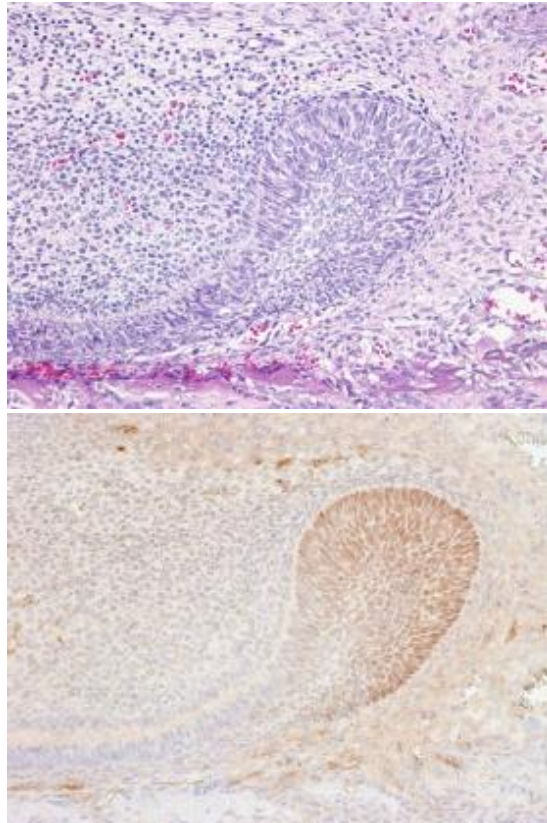


図3 生後2日の下顎切歯歯胚
(上段: HE 染色、下段: 免疫染色 (Sox2))

生後2日マウスの下顎切歯歯胚 sox2 の発現はmRNA のレベルでも認めた (図4)。

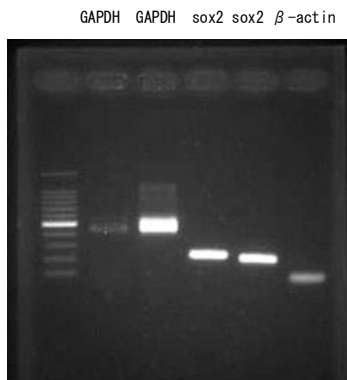


図4 マウス下顎歯根尖サービカルループにおけるmRNA の解析

(3) 結果3 腎臓への in vivo 移植実験
歯胚移植後4週目に採取した腎臓を並べてエックス線マイクロCT装置にて撮影すると、石灰化物の生成が認められた (図5)。

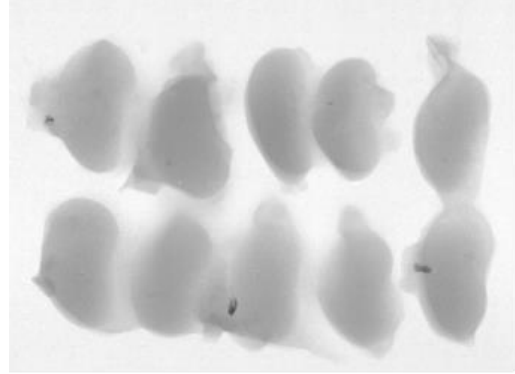


図5 腎臓皮膜下における石灰化物の形成

さらに、断層写真として観察すると、石灰化物は歯髓腔を有する歯の構造を作っていることが確認された (図6)

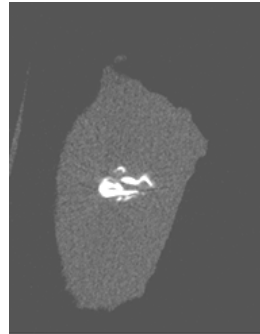


図6 中空の石灰化物の断層像

(4) 結果4 幹細胞の分離培養の試み
コラーゲンディッシュ上にて初期培養上皮系細胞は明瞭なスフェロイド状の細胞塊を形成した (図7) 中央に見えるのは細胞のソースとなったサービカルループ由来の細胞である。上皮系と間葉系の細胞の間には明瞭な境界線が認められた。さらに上皮系細胞と間葉系細胞の境界面では細胞の分化が観察された (図8)。



図7 培養後3週の上皮系の細胞塊



図8 培養後5週における境界面での細胞分化

マウスの歯胚の採取に当たっては、顕微鏡下での微細な操作が必須であり、研究者らはこの方法を独自に確立することができた。本研究では、組織を一魁として捉え、その中に発現している遺伝子群を比較検討している。組織の中から目的とする幹細胞やニッチ細胞を、細胞活性を残した状態で単離して分析することは組織においては難しく、この手法の確立にはもう少し時間が必要と考えている。

本実験では幹細胞に特異的な幾つかの遺伝子の発現を確認することができた。

Juuriら(2012)らは、Cell誌にマウス切歯根尖部の幹細胞はSox2によって分化が抑えられていることを報告した。この発見に基づいて我々の実験結果をSox2について再検証したところ老齢マウスにおいてはSox2の発現は低下していた。しかし老齢マウスにおいても歯髓細胞におけるNanogの発現は引き続き認められることから、細胞ソースそのものの量は減少しているものの、メッセンジャーRNAにて確認できる幹細胞としての特性は歯髓内に残っていると予想された。

現在、腎臓皮膜下にて分化生長した組織の病理切片を作成中であり、蛍光顕微鏡下にてGFPマウス由来の組織再生を観察する予定である。さらに細胞シート工学を応用して上皮組織と間葉系組織に分け、2つの組織の相互作用をin vitroにて観察し、さらに腎臓に移植して生体内での反応を観察する計画をすすめている。

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8件)

① Mori, N., Ohno, J., Sakagami, R., Hayakawa, T., Fukushima, T. (2013) Cell viabilities and biodegradation rates of DNA/protamine complexes with two different molecular weights of DNA. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, (in press)
DOI: 10.1002/jbm.b.32877

② Ohgi, K., Kajiya, H., Okamoto, F., Nagaoka, Y., Onitsuka, T., Nagai, A., Sakagami, R., Okabe, K. (2013) A novel inhibitory mechanism of nitrogen-containing bisphosphonate on the activity of Cl⁻ extrusion in osteoclasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, (in press)
DOI: 10.1007/s00210-013-0857-0

③ Sano, S., Sakagami, R., Sekiguchi, M., Hidaka, M. (2013) Stabilization of MAP01 by specific binding with folliculin and AMP-activated protein kinase in O⁶-methylguanine-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 430, 810-815.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.064

④ Lim, T. H., Fujikane, R., Sano, S., Sakagami, R., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M., Hidaka, M. (2012) Activation of AMP-activated protein kinase by MAP01 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. *DNA Repair*, 11, 259-266.
DOI: 10.1016/j.dnarep.2011.11.006

⑤ Ohgi, K., Okamoto, F., Kajiya, H., Sakagami, R., Okabe, K. (2011) Antibodies against ClC7 inhibit extracellular acidification-induced Cl currents and bone resorption activity in mouse osteoclasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 383, 79-90.
DOI: 10.1007/s00210-010-0576-8.

⑥ Mori, N., Iwahashi, T., Ohno, J., Shinozaki, Y., Sakagami, R., Mitarai, M., Fukushima, T. (2011) Cell Viability and Tissues Response of High Molecule Weight DNA/protamine Complex. *J Oral Tissue Engineering*, 8, 188-194.
DOI:10.11223/jarde.8.188

⑦Fukushima, T., Ohno, J., Imayoshi, R., Mori, N., Sakagami, R., Mitarai, M., Hayakawa, T. (2011) DNA/protamine complex paste for an injectable dental material. J Mater Sci Mater Med, 22, 2607-2615. DOI:10.1007/s10856-011-4446-9

⑧ Kitamura, M., Akamatsu, M., Machigashira, M., Hara, Y., Sakagami, R., Hirofuji, T., Hamachi, T., Maeda, K., Yokota, M., Kido, J., Nagata, T., Kurihara, H., Takashiba, S., Sibutani, T., Fukuda, M., Noguchi, T., Yamazaki, K., Yoshie, H., Ioroi, K., Arai, T., Nakagawa, T., Ito, K., Oda, S., Izumi, Y., Ogata, Y., Yamada, S., Shimauchi, H., Kunimatsu, K., Kawanami, M., Fujii, T., Furuichi, Y., Furuuchi, T., Sasano, T., Imai, E., Omae, M., Yamada, S., Watanuki, M., Murakami, S. (2011) FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. J Dent Res, 90, 35-40. DOI: 10.1177/0022034510384616

〔学会発表〕 (計 6 件)

①Murakami, H., Okamura K., Hatta, M., Sakagami, R., Yamazaki, J.: Comparison of caspase-14 and filaggrin expression between cornified and non-cornified stratified epithelia. 第 86 回日本薬理学会、福岡、平成 25 年 3 月 22 日

②Hiromatsu, R., Hatta, M., Ohkubo, T., Sakagami, R., Yamazaki, J.: Regulation of expression of chloride channel accessory protein CLCA in differentiated epithelial cells. 第 86 回日本薬理学会、福岡、平成 25 年 3 月 22 日

③Hidaka, M., Sano, S., Fujikane, R., Lim, T., Sakagami, R., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M.: Molecular mechanism of the induction of apoptosis to suppress mutation and cancer. 第 35 回日本分子生物学会、福岡、平成 24 年 12 月 12 日

④Sano, S., Sakagami, R., Sekiguchi, M., Hidaka M.: Stabilization of MAP01 during the process of apoptosis induction. 第 35 回日本分子生物学会、福岡、平成 24 年 12 月 13 日

⑤丸尾直樹、岡村和彦、谷口邦久、坂上竜資: マウス下顎切歯根尖部の多能性幹細胞における Sox2 の発現、第 39 回福岡歯科大学学会、

福岡、平成 24 年 11 月 18 日

⑥大城希美子, 鍛冶屋浩, 岡本富士雄, 堤貴司, 鬼塚得也, 永井淳, 坂上竜資, 岡部幸司. ビスフォスフォネートの新しい作用点としてのマウス破骨細胞 Clcn7 Cl⁻輸送体. 第 89 回日本生理学会、長野県松本市、平成 23 年 3 月 30 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕 (計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/2_2_1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂上 竜資 (SAKAGAMI RYUJI)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 50215612

(2) 研究分担者

永井 淳 (NAGAI ATSUSHI)
福岡歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 70252989