

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 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791774

研究課題名（和文）リアルタイムイメージングを用いた Hertwig 上皮鞘断裂メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of the disintegration of Hertwig's epithelial root sheath by using a real time imaging

研究代表者

大津 圭史（OTSU KEISHI）

岩手医科大学・歯学部・ポストドクター

研究者番号：60509066

研究成果の概要（和文）：

歯根の形成は Hertwig 上皮鞘 (HERS) の誘導によって進んでいくが、HERS の細胞動態については未だ不明な点が多い。本研究課題では、上皮間葉転換 (EMT) が HERS の断裂を引き起こすことを証明するために、われわれが歯冠形成期歯胚の観察に用いているリアルタイムイメージングに改良を加え、HERS の動態を直接可視化する実験システムの構築をおこなうことを目的とした。GFP マウスの歯胚組織を薄切培養し、HERS 形成をリアルタイムで観察する方法を確立した。この実験系をもちいて、HERS が形成される際の細胞の動き、分裂、actin プロモーター活性をリアルタイムで観察することが出来た。マウス臼歯歯胚より HERS 由来細胞を単離培養し、HERS 細胞株として樹立した。この細胞は、上皮由来細胞マーカー同様、間葉細胞マーカータンパクも発現し、TGF- β に刺激に対してさらに間葉細胞マーカー遺伝子、EMT 関連遺伝子の発現量を増加させることが分かった。また、歯根の伸張は HGF の添加によって細胞増殖を伴う形で増強されることが明らかとなり、HGF シグナリングと歯根発生との関わりが示された。

研究成果の概要（英文）：

Tooth root formation is initiated by the development of Hertwig's epithelial root sheath (HERS) from the cervical loop in the enamel organ. However, the cellular dynamics during HERS formation is not well known yet. In This study, we aimed to establish the experimental system to visualize the dynamics of HERS cells in order to elucidate the mechanism of HERS disintegration by EMT. We established the real time slice culture imaging system, which could observe the migration, division, and actin promoter activity in HERS cell. We also established HERS cell line from mouse molars. The cells expressed mesenchymal cell markers, and the expressions were increased to the stimulation of TGF- β . The root elongation was intensified by HGF with the increased cell proliferation, indicating the implication between HGF signaling and tooth root formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード： 歯根、発生、Hertwig's 上皮鞘、EMT、ROCK

1. 研究開始当初の背景

歯根の形成は Hertwig 上皮鞘 (HERS) の誘導によって進んでいくが、HERS の細胞動態については未だ不明な点が多い。われわれはこの問題に取り組み、新規に開発したリアルタイムイメージングによって、HERS は外エナメル上皮より形成されることを明らかにした (原田、大津、日本基礎歯科医学会総会 2009, Fig. 1)。しかし、その後起こる HERS 断裂のメカニズムには、1) 上皮細胞から間葉細胞への転換説 (epithelial-mesenchyme transition; EMT) と、2) アポトーシス説とがあり、現在まで議論が分かれている。

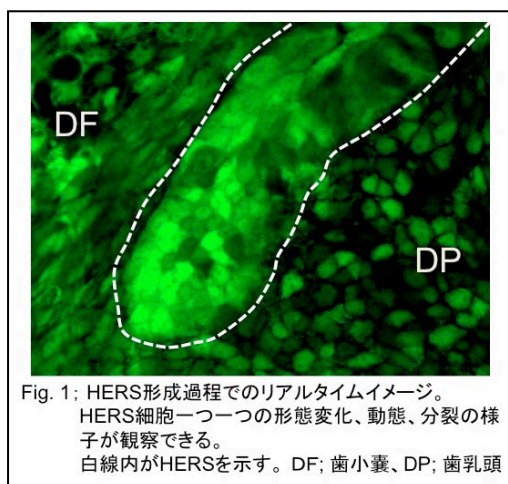


Fig. 1: HERS形成過程でのリアルタイムイメージ。HERS細胞一つ一つの形態変化、動態、分裂の様子が観察できる。白線内がHERSを示す。DF; 歯小嚢; DP; 歯乳頭

われわれは、Rho ファミリータンパク (細胞骨格、細胞接着等を制御する small GTPase) がエナメル上皮細胞に果たす役割を研究している過程で (大

津, 若手スタートアップ採択課題, 2008年)、Rho タンパク下流のエフェクター分子 ROCK の抑制剤が、エナメル上皮細胞に EMT を引き起こすことを見いだした (Fig. 2)。

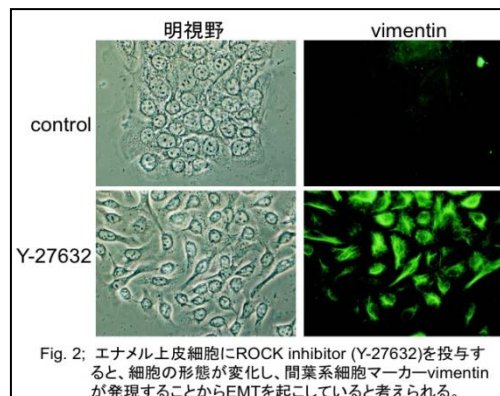


Fig. 2: エナメル上皮細胞にROCK inhibitor (Y-27632)を投与すると、細胞の形態が変化し、間葉系細胞マーカー-vimentinが発現することからEMTを起こしていると考えられる。

この結果は、われわれが樹立した HERS 由来細胞株でも同様に観察され (Fig. 3)、HERS の断裂に ROCK の機能喪失による EMT が関係している可能性が示唆された。

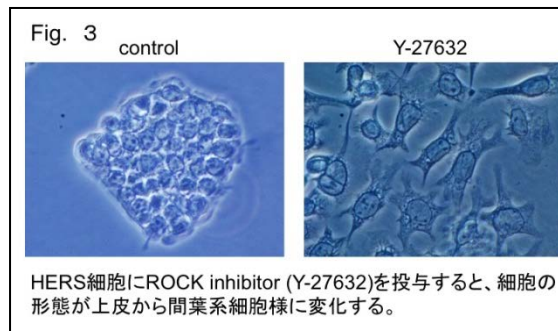


Fig. 3 HERS細胞にROCK inhibitor (Y-27632)を投与すると、細胞の形態が上皮から間葉系細胞様に変化する。

従来の、HERS の断裂が EMT によるもの

だとする研究は (Thomas, 1995, Sonoyama, 2007)、培養細胞によるデータと、断片的な組織学的解析が主であり、生体内の EMT を実際に捉えた報告はない。またこの EMT を制御する細胞内シグナル伝達機構についても十分に解析されていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、EMTが HERSの断裂を引き起こすことを証明するために、われわれが歯冠形成期歯胚の観察に用いているリアルタイムイメージングに改良を加え、HERSで起こるEMTを直接可視化する実験システムの構築をおこなうことを目的とした。そしてこのシステムに、Rhoシグナリングの研究結果を組み合わせ、いままで不明であったHERS断裂とEMT、Rhoシグナリングとの関係について明らかにする。

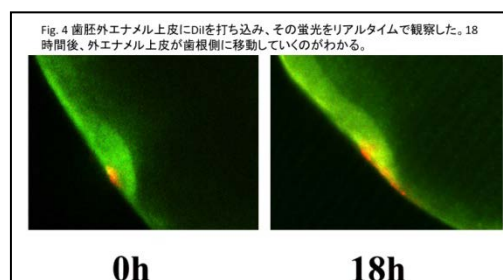
3. 研究の方法

1. GFP マウスを用いたHERS 断裂観察のためのslice culture イメージングシステムの確立
GFP マウスの歯胚組織を薄切培養し、HERS 形成をリアルタイムで観察する方法に対しての最適な実験条件 1) 試料の選択、2) 薄切厚さ、3) 培養液の組成、4) 包埋剤(寒天、ゼラチン等)、5) 共焦点顕微鏡での画像取得のセッティング、の検討を行った。
2. HERS 培養細胞の確立と TGF- β の効果の検討
マウス臼歯より HERS 細胞を摘出し、細胞株の確立を行った。またこの細胞株に TGF- β を作用させたときの遺伝子発現の変化 (とくに EMT 関連遺伝子) を real time RT-PCR をもちいて検討した。
3. 臼歯歯根伸張、HERS 細胞株に対する HGF の役割の解明
HERS における HGF レセプターの発現をパラフィン切片を用いた免疫組織学によって確認した。器官培養したマウス臼歯、腎皮膜移植したマウス臼歯に HGF,

HGF の中和抗体を作用させ、その歯根伸張に対する効果を組織学的に解析した。培養 HERS 細胞に HGF を作用させ、その細胞増殖に対する効果を検討した。

4. 研究成果

1. GFP マウスの歯胚組織を薄切培養し、HERS 形成をリアルタイムで観察する方法を確立した。本研究に対しての最適な実験条件 ; 薄切厚さ(150 μ m)、培養液の組成(DMEM/F12, 10% FBS, アスコルビン酸)、包埋剤(low melting point agarose)、共焦点顕微鏡での画像取得のセッティングの検討を行い。指摘条件を決定した。この実験系をもちいて、HERS が形成される際の細胞の動き、分裂、actin プロモーター活性をリアルタイムで観察することが出来た。また、器官培養した歯胚の外エナメル上皮細胞に DiI を打ち込み、HERS 形成時における外エナメル上皮の細胞の動きをリアルタイムで観察する系を確立した(Fig. 4)。



その結果、細胞分裂は内エナメル上皮細胞に比べ、外エナメル上皮細胞で活発に行われ、外エナメル上皮細胞が HERS 形成とともに歯根方向に移動していく様子をリアルタイムで捕らえることに成功した。この実験から、HERS が主に外エナメル上皮の分裂、伸張によって形成されることが実証され、この結果は現在論文にまとめ投稿準備中である。

2. マウス臼歯歯胚より HERS 由来細胞を単離培養し、HERS細胞株として樹立した。この細胞は、上皮由来細胞マーカー同様、間葉細胞マーカータンパ

クも発現し、TGF- β に刺激に対してさらに間葉細胞マーカー遺伝子、EMT 関連遺伝子の発現量を増加させることが分かった (Fig. 5)。

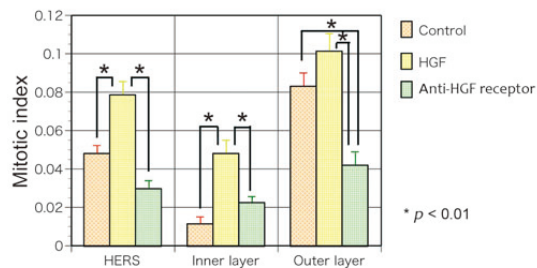
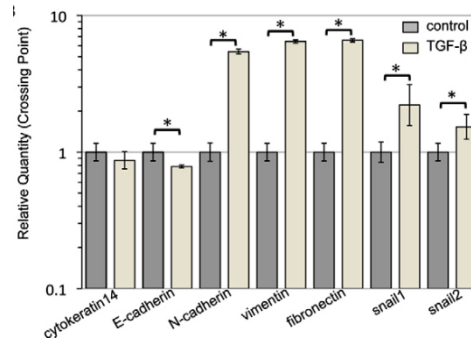


Fig. 5

このことから HERS 形成、断裂のプロセスに EMT が強く関わっている可能性が示唆された。また iPS 細胞が神経堤細胞、歯原性間葉細胞へと分化誘導されるとき、HERS 細胞と同様な EMT 関連遺伝子の発現増加が見られることが分かった。これらの結果より、この細胞株が歯根形成における有用な研究ツールとして用いることができると考えられた。この結果の一部は論文としてまとめられ 2011 年 BBRC にて発表された。さらに第 53 回基礎歯科医学会にて発表された。

- Rho シグナリングは HGF によって制御されていることが報告されているため、われわれは歯根伸張における HGF の作用を検討した。HGF レセプターはエナメル上皮細胞と HERS 細胞で発現が認められ、HGF は器官培養したマウス臼歯歯根、腎被膜移植した臼歯歯根の伸張と、培養 HERS 細胞の増殖を増強させた。また HGF の HERS における細胞増殖効果は、内エナメル上皮細胞にくらべ外エナメル上皮細胞で顕著に見られ、その効果は HGF 中和抗体によって抑制された (Fig. 6)。これらの結果は 2012 年に Journal of Periodontal Research に発表された。

Fig. 6



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)

Akimoto, T., Fujiwara, N., Kagiya, T., Otsu, K., Ishizeki, K., Harada, H. Establishment of Hertwig's epithelial root sheath cell line from cells involved in epithelial-mesenchymal transition. BBRC, 2011, 404, 308-312

Otsu, K., Kishigami, R., Fujiwara, N., Ishizeki, K., Harada, H. Functional role of Rho-kinase in ameloblast differentiation. J. Cell Physiol. 2011. 226. 2527-2534

Sakuraba, H., Fujiwara, N., Sasaki-Oikawa, A., Sakano, M., Otsu, K., Ishizeki, K., Harada, H. Hepatocyte growth factor stimulates root growth during the development of mouse molar teeth. J. Period. Res. 2011 47. 81-88

Kishigami, R., Otsu, K., Oikawa-Sasaki, A., Fujiwara, N., Ishizeki, K., Tabata, Y., Harada, H. Histological analysis of epithelial stem cells during induced pluripotent stem cell-derived teratoma development. J. Oral Biosci. 2012 54 54-58

Otsu, K., Kishigami, R., Oikawa-Sasaki, A., Fukumoto, S., Yamada, A., Fujiwara, N., Ishizeki, K., Harada, H. Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. Stem Cells & Dev. 2012 in press

Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu, K., Harada H, Yamada Y, Fukumoto S. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. J. Biol. Chem. 2012 287 10590-10601

原田英光, 大津圭史, 藤原尚樹, 石関清人, 及川愛. 再生医学に関する新設講義の受講アンケートの結果と考察. 日歯教誌 2011 27 63-68

及川 愛, 大津圭史, 藤原尚樹, 石関清人, 中富満城, 大島勇人, 原田英光 エナメル質の横紋形成メカニズムの解明 岩医大歯誌 2012 in press

[学会発表] (計 23 件)

Keishi Otsu, Role of Rho kinase in amelogenesis, Gordon Research Conferences, 2010/4/9-18, Il Ciocco Hotel and Resort, Lucca, Italy

Hidemitsu Harada, Keishi Otsu, Live cell imaging of Hertwig's epithelial root sheath formation process, Gordon Research Conferences, Gordon Research Conferences, 2010/4/9-18, Il Ciocco Hotel and Resort, Lucca, Italy

Ai Sasaki, Keishi Otsu, New hypothesis of cross-striation formation mechanism. 10th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation. 2010 9.1-9.4. Berlin, Germany

Ryota Kishigami, Keishi Otsu, Neural crest like cells from induced pluripotent stem cells for tooth regeneration. International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation. 2010 9.1-9.4. Berlin, Germany

Keishi Otsu, Visualizing cellular dynamics of tooth development. International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation. 2010 9.1-9.4 Berlin, Germany

Hisayo Mayama, Keishi Otsu, Cell culture of human dental epithelial cells and its approach for regenerative dentistry.. International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation. 2010 9.1-9.4. Berlin, Germany

Naoki Fujiwara, Keishi Otsu, Establishment of immortalized Hertwig's epithelial root sheath cells and character of cell line. International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation. 2010 9.1-9.4. Berlin, Germany

藤原尚樹, 大津圭史, Hertwig上皮鞘細胞の特性とEMTの可能性、第115回日本解剖学会総会全国学術集会、3月28-30、盛岡

岸上良太, 大津圭史, iPS細胞由来奇形腫

における上皮細胞の分化解析と歯の再生への可能性、第10回日本再生医療学会総会、3月1-2日、東京

大津圭史、歯の再生に向けたiPS細胞から神経堤細胞への分化誘導、第10回日本再生医療学会総会、3月1-2日、東京

原田英光, 大津圭史、Live cell imaging of dental epithelial stem cells. 第116回日本解剖学会総会全国学術集会、3月28-30、横浜

佐々木愛, 大津圭史、エナメル横紋形成のメカニズムに関する新規仮説、岩手医科大学歯学会第69回例会、2/27、2010、岩手医大(盛岡)

岸上良太, 大津圭史、iPS細胞由来奇形腫における上皮細胞の分化解析と歯の再生への応用、岩手医科大学歯学会 第70回例会 7/3、2010 岩手医大(盛岡)

大津圭史、Neural Crest like Cell from Induced Pluripotent Stem Cells for Tooth Regeneration、Frontier Meeting、2010. 2011/2/25-26、日大会館(東京都)

藤原尚樹, 大津圭史、Establishment of Hertwig's epithelial root sheath cell line from cells involved in epithelial-mesenchymal transition、Frontier Meeting、2010. 2011/2/25-26 日大会館(東京都)

大津圭史 歯の再生に向けたiPS細胞から歯原性間葉細胞への分化誘導 第53回歯科基礎医学会学術大会 平成23年10月2日 長良川国際会議場・岐阜市

Otsu, K Functional role of Rho signaling in dental epithelial stem cells, Gordon Research Conference, Bone and Tooth, 2011年6月18-19日 Les Diablerets, Switzerland

石関清人, 大津圭史, 藤原尚樹, 原田英光, ツチ骨とキヌタ骨の形成とメッケル軟骨との関連性第53回歯科基礎医学会学術大会・総会 2011年9月31日

及川 愛, 大津圭史, 藤原尚樹, 石関清人, 中富満城, 大島勇人, 原田英光 アメロゲニンの概日的発現周期に関わるMsx2の役割第53回歯科基礎医学会学術大会・総会 2011年9月31日 長良川国際会議場(岐阜)

藤原尚樹, 櫻庭春菜, 坂野深香, 佐々木-及

川 愛, 大津圭史, 石関清人, 原田英光
Hepatocyte growth factorはマウス臼歯歯胚
の歯根形成を促進する. 第 53 回歯科基礎
医学会学術大会・総会 2011 年 10 月 1 日 長良
川国際会議場 (岐阜)

Keishi Otsu, Hidemitsu Harada , The role
of Rho signaling pathway in dental
epithelial stem cells. Gordon Research
Conference, Craniofacial development an
regenerative medicine. 2012 年 3 月 17-24
日 CA, U.S.A.

大津圭史 原田英光 ライブイメージングで
とらえる歯の発生メカニズム (招待講演)
第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術大会
研究集会・懇話会 2012 年 3 月 26 日山梨大学
(山梨)

Keishi Otsu, Ryota Kishigami, Ai
Oikawa-Sasaki, Naoki Fujiwara, Kiyoto
Ishizeki, Hidemitsu Harada The role of
Rho signaling pathway in dental epithelial
stem cells. 第 117 回 日本解剖学会総会・全
国学術大会 研究集会・懇話会 2012 年 3 月
26 日山梨大学 (山梨)

[図書] (計 1 件) [その他]

Keishi Otsu, Naoki Fujiwara, Hidemitsu
Harada, Human Press SPRINGER
SCIENCE, Organ Cultures and
Kidney-Capsule Grafting of tooth germs,
(Eds: Chrissa Kioussi Odontogenesis:
Methods and Protocols, in press

ホームページ等
<http://oralhist.iwate-med.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大津 圭史 (KEISHI OTSU)

研究者番号 : 60509066