

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25862035

研究課題名(和文)低ホスファターゼ症モデルマウスの歯髄幹細胞の分析

研究課題名(英文)Analysis of dental pulp stem cells derived hypophosphatasia model mice

研究代表者

根本 晴子(山本晴子)(NEMOTO-YAMAMOTO, Seiko)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：10633943

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):低ホスファターゼ症(HPP)は、組織非特異型アルカリホスファターゼ(TNALP)の遺伝子変異によって起こる疾患である。TNALPは全身に発現しているにもかかわらず、症状は歯や骨に認められ、くる病や骨軟化症様の症状や歯の異常をきたす。歯の異常はHPPのどの病型にも認められるが、エナメル質の欠損について原因は明らかとなっていない。

本研究では、HPPモデルマウスの歯髄幹細胞を含む細胞を用いて、マイクロアレイ解析および生後5日の歯胚を用いて遺伝子発現の定量を行った。HPPモデルマウスにおいて、野生型と比較しエナメルタンパク遺伝子の発現が低く、エナメル質形成に影響している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):Hypophosphatasia (HPP) is caused by mutation of the gene tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNALP). TNALP is expressed in many tissues of the body. HPP have been various symptoms such as rickets, osteomalacia and dental manifestations. Dental symptoms are commonly shown in all types of HPP. However, cause of enamel defect is still unexplained. In this study, we compared between HPP model (KO) mice and wild type(WT) mice as control mice by microarray analysis using dental pulp stem cells. Microarray analysis revealed the genes related enamel development decreased in KO mice. Additionally, the gene expression levels of Amelx, Ambn and Enam in KO mice were lower than WT mice with RT-qPCR. Particularly, amount of Ambn and Enam significantly decreased ($p < 0.05$). It is suggested that missing TNALP gene may affect to enamel defect in KO mice as the result of decreased the enamel matrix protein genes expression. Our study might help the elucidation in cause of enamel defects in human HPP.

研究分野：小児歯科学

キーワード：アルカリホスファターゼ 低ホスファターゼ症 歯髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) Dr. José Juis Millán は、1977 年よりアルカリホスファターゼ (以下: ALP) について研究を行ってきた。そして、Dr. Millan らは、非組織特異型アルカリホスファターゼ (以下: TNALP) を遺伝的欠損させた、硬組織形成不全を呈する低ホスファターゼ症モデルマウスを作成した。これまで Dr. Millan と共同研究を行い、低ホスファターゼ症モデルマウスを利用した治療研究や石灰化に関与する様々な酵素について研究を行ってきた経緯がある。現在までに石灰化異常を呈する疾患の原因解明や治療法の開発に関った経験を生かし、まだ明らかにされていない石灰化機序をこの低ホスファターゼ症モデルマウスを利用し分析を行っていくことの発想に至った。また、モデルマウスにおいてセメント質や象牙質の異常について研究は多くなされているが、エナメル質の異常については未だ報告は少ない。

2. 研究の目的

(1) 低ホスファターゼ症モデルマウスの歯髄細胞由来の体性幹細胞を培養し分化能を評価、それらの分化した細胞を DNA マイクロアレイによる分析を行う。そして TNALP を取り巻く遺伝子や、石灰化に関与する遺伝子の発現レベルを DNA マイクロアレイに解析を行い、石灰化の機序を明らかにすることを目的としている。

(2) 歯髄由来の幹細胞の培養条件や分化能や分化した細胞の誘導条件を明らかにし、歯髄由来の幹細胞のより有効な医療への応用を進展させることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 低ホスファターゼ症モデルマウスの作製
低ホスファターゼ症モデルマウスのヘテロを交配させ、野生型と低ホスファターゼ症モデルマウスを得た。遺伝子型確認及び個体識別のため、マウスの足先を切りサンプルを得た。得られたサンプルから DNA を抽出し PCR、電気泳動を行い、遺伝型を確認した。

(2) 低ホスファターゼ症モデルマウスの歯髄細胞から幹細胞を分離培養

① 5-10 日齢のマウスの上下顎骨の前歯及び臼歯の歯胚を摘出し培養を行った。当初の予定では、コラゲナーゼ処理を行って細胞を酵素分解して培養する予定であったが、細胞のロスを少なくするため 1 mmx3mm 角に切っ

た歯髄を培養ディッシュに置き、外生法にて細胞培養を行った。

② 外生法で培養したのち、EDTA トリプシンにて細胞を剥がし、本培養を行った。この後、幹細胞を単離する予定であったが、細胞数が不十分であったため単離せず培養細胞をそのまま実験に用いた。

(3) 培養した幹細胞の分化細胞の分析を行う。

① 幹細胞の分化能分析

低ホスファターゼ症モデルマウス幹細胞の培養し、軟骨細胞・骨細胞・線維細胞を得る予定であったが、今回は培養した細胞を軟骨細胞誘導細胞培地にて 2 1 日間培養して軟骨細胞を得た。継代培養し使用した世代は 2-4 世代のみとした。トルイジンブルーを用いて軟骨細胞の確認を行った。

② 分化細胞を用いマイクロアレイ解析を行う。

① で得られた軟骨分化細胞を使用する予定であったが、今回分化細胞を用いず、得られた幹細胞を含む培養細胞を用いて実験を行った。外生法にて細胞を培養した後に、野生型と低ホスファターゼ症モデルマウス由来の各細胞を 1×10^5 個の細胞を 6 ウェルディッシュに培養した。培養後 3 日に細胞を回収し、トータル RNA を得た。得られた RNA より RT-PCR を行い、cDNA を増幅した。cDNA を用いマイクロアレイ (アジレント・テクノロジー社製) にて野生型と低ホスファターゼ症モデルマウスの発現遺伝子及び発現量の分析を行った。使用した世代は 2 世代のみとした。

結果は、 $\Delta \Delta CT$ 法にて野生型と相対比較し、log2 比にて分析を行った。

(4) 骨に関わる遺伝子の発現、また発現量を分析しターゲット遺伝子を決定する。

当初は骨に関する遺伝子の分析予定であったが、(3)の結果から今回はエナメル質に関わる遺伝子の発現量を定量した。生後 5 日のマウスの右側下顎第一大臼歯を摘出し、トータル RNA を抽出した。得られた RNA を RT-PCR キットを用いて逆転写して cDNA を得た。cDNA と TaqMan プローブ、Amelx (Thermo Fisher Scientific Mm00711642_m1)、Ambn (Thermo Fisher Scientific Mm00477486_m1)、Enam (Thermo Fisher Scientific Mm00516922_m1) を使用し、野生型と低ホスファターゼ症モデルマウスの遺伝子発現をリアルタイム PCR にて定量を行い、比較を行った。

4. 研究成果

(1) 幹細胞の分化能の解析

今回歯髄由来の幹細胞含む細胞を、軟骨誘導培地にて

培養し21日後にトルイジンブルーで染色したところ、青く染色された軟骨様の細胞を認めた。低ホスファターゼ症モデルマウス由来の細胞は、軟骨様細胞へ分化したが、野生型と比較して、増殖能に乏しく細胞数を得難いということが明らかとなった。ゆえに実験に用いる十分な細胞数が得られず、今回は分化能の解析に至らなかった。

(2)培養幹細胞マイクロアレイ解析

培養幹細胞のマイクロアレイ解析を行い、野生型と低ホスファターゼ症モデルマウスの約6万遺伝子の発現を比較したところ、低ホスファターゼ症モデルマウスにおいてTNALP遺伝子の発現が最も低いことがわかった。また、アメロジェニン遺伝子の発現が3番目に低い結果となった。このことから、エナメル質の形成に関係する遺伝子の検索を行った。その結果を表1に示した。低ホスファターゼ症モデルマウスにおいてエナメル基質タンパクである、アメロジェニン遺伝子(*Ame1x*)、エナメルリン遺伝子(*Enam*)、アメロプラスチン遺伝子(*Ambn*)、アメロチン遺伝子(*Amtn*)の発現が、野生型と比較して有意に少ないことがわかった。また、エナメル質形成不全症の原因遺伝子の一つであるカリクレイン4遺伝子(*Klk4*) エナメル質の成熟に関与するタンパク分解酵素である象牙質シアロリントタンパク遺伝子(*Dspp*)も低い傾向にあった。一方、象牙質マトリックスタンパク(*Dmp1*)I型コラーゲン α II遺伝子(*Colla2*)は野生型と比較し、あまり違いを認めない傾向にあった。エナメライン遺伝子(*MMP20*)、I型コラーゲン α I遺伝子(*coll1a1*)については、遺伝子発現データがなかった。マイクロアレイ解析から、野生型と比較して低ホスファターゼ症モデルマウスにおいて、特にエナメルマトリックスタンパク遺伝子が野生型と比較して低かった。このことから、低ホスファターゼ症モデルマウスにおけるエナメル質の形成不全へのTNALP遺伝子の欠損が関連する可能性が示唆された。

| Symbol | Gene related to enamel and dentin formation | Log2 ratio |
|---------------|--------------------------------------------------|------------|
| <i>Alpl</i> | Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme | -7.32 |
| <i>Ame1x</i> | amelogenin | -6.21 |
| <i>Enam</i> | enamelin | -2.72 |
| <i>Ambn</i> | ameloblastin | -1.34 |
| <i>Amtn</i> | amelotin | -3.72 |
| <i>Mmp20</i> | matrix metalloproteinase-20 | NO data |
| <i>Klk4</i> | kallikrein-related peptidase 4 | -1.75 |
| <i>Dmp1</i> | Dentin matrix acidic phosphoprotein 1 | -0.64 |
| <i>Dspp</i> | Dentin sialophosphoprotein | -1.05 |
| <i>Colla1</i> | Collagen type I alpha 1 | No data |
| <i>Colla2</i> | Collagen type I alpha 2 | -0.276 |

表1 マイクロアレイ解析結果

(3)低ホスファターゼ症モデルマウスにおけるエナメル質形成に関与する遺伝子のリアルタイムPCRによる定量

本研究において、今回は生後5日のマウスにおける3つのエナメルマトリックスタンパクの遺伝子発現の定量を行った。*Ame1x*の野生型(WT)と低ホスファターゼ症モデルマウス(KO)のグラフを図1に示した。*Ame1x*はエナメルタンパクの約90%を占める。エナメル質の形成されるためエナメル質の結晶の成長に重要な役割を果たすことが知られている。*Ame1x*遺伝子の欠損マウスにおいて、エナメル質の厚みが薄くなるのが大きな特徴とされている。今回、野生型と低ホスファターゼ症モデルマウスを比較した結果、低ホスファターゼ症モデルマウスは野生型に比べて、有意差は認められなかったが、発現が低い傾向にあった。

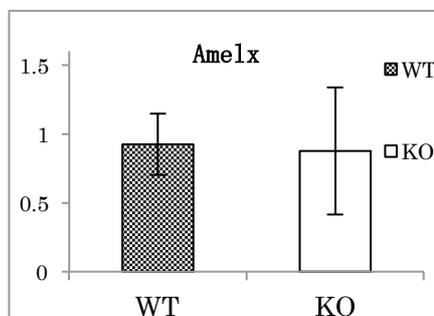


図1 アメロジェニン遺伝子の発現量の比較

*Ambn*のWTとKOの比較のグラフを図2に示した。*Ambn*はエナメル芽細胞の基質への接着や、細胞の文化に関わるとされている。*Ambn*遺伝子の欠損マウスはエナメル質形成不全症を呈することが知られている。また、*Ame1x*や*Enam*も著しく低下しているとの報告もある。今回の結果、低ホスファターゼ症モデルマウスは有意に*Ambn*遺伝子が低下していた($p < 0.01$)。

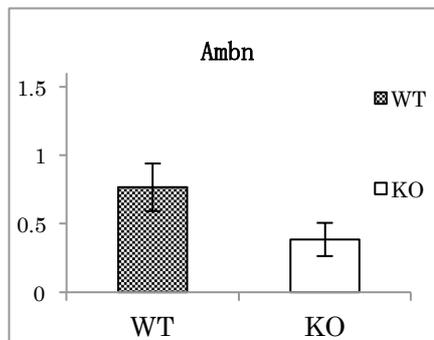


図2 アメロプラスチン遺伝子の発現量の比較

*Enam*のWTとKOの比較のグラフを図3に示した。

エナメル質における *Enam* 遺伝子の役割は、未だ明らかにはなっていない。*Enam* 遺伝子欠損マウスでは、エナメルが細胞の多層化やエナメル器の構造の乱れが認められエナメル質の形成が開始しなかったとの報告がある。今回低ホスファターゼ症モデルマウスは有意に *Enam* 遺伝子が低下していた ($p < 0.05$)。

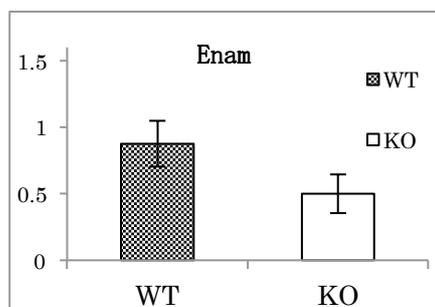


図3 エナメル質遺伝子の発現量の比較

これら3つのエナメルマトリックスタンパクの遺伝子発現の定量により、低ホスファターゼ症モデルマウスの *Ambn* 遺伝子および *Enam* 遺伝子が低下していることが明らかとなった。これらのタンパクは、エナメル質形成や成熟、歯の形成に大きく関与することが知られており、低ホスファターゼ症モデルマウスにおいて、エナメル質形成へ影響を及ぼしている可能性が示唆された。

<引用文献>

- ①Yadav MC 他. JBMine Res.2012;27(8):1722-1734.
- ②Hatakeyama J,他 Synergistic roles of amelogenin and ameloblastin. J Dent Res. 2009;88(4):318-22.
- ③Sawada T,他 Histological and immunohistochemical analyses of molar tooth germ in enamelin-deficient mouse.2011;113(5):542-6.
- ④ Chun YH 他 Transgenic rescue of enamel phenotype in *Ambn* null mice. J Dent Res. 2010;89(12):1414-20.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計3件)

①Seiko Nemoto-Yamamoto, Study of enamel defect of murine hypophosphatasia, 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 平成28年5月27日、東京ドームホテル (東京都・文京区)

②Eri Yokoi, Seiko Nemoto-Yamamoto, Differentiation

potential of dental pulp stem cells derived from hypophosphatasia model mouse, the 25th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry, 平成27年7月1-4日、グラスゴー (英国)

③横井絵理、根本 (山本) 晴子、低ホスファターゼ症モデルマウスにおける歯髄幹細胞の分化能分析、第53回日本小児歯科学会大会、平成27年5月21-22日、広島国際会議場 (広島県・広島市)

[図書] (計0件)

[産業財産権] (計0件)

[その他] (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

根本 晴子 (NEMOTO-YAMAMOTO, Seiko)
 日本大学・松戸歯学部 小児歯科学・助教
 研究者番号: 10633943

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

横井 絵理 (YOKOI, Eri)