

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10065

研究課題名(和文) In vivoライブイメージングによるエナメル質形成機構の動的解析

研究課題名(英文) In vivo live imaging in amelogenesis

研究代表者

進 正史 (Shin, Masashi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：70549261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯のエナメル質の形成機構を解析するために、独自に開発したエナメル芽細胞を蛍光標識するマウスの解析を行った。第一に、このマウスのエナメル上皮から細胞を分離培養、あるいはゲル中で3次元培養することに成功した。次に、エナメル質形成に必須のMatrix metalloproteinase-20 (MMP20)の欠損マウスおよび過剰発現マウスとエナメル芽細胞標識マウスを掛け合わせ、顎骨を透明化し3次元観察すると、MMP20過剰発現では細胞配列が顕著に乱れていた。さらに、生きたままのエナメル芽細胞を観察できるタイムラプスイメージング技術の開発を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりエナメル芽細胞の動態を試験管内とマウスの生体内で観察することができるようになってきた。開発中のエナメル芽細胞のタイムラプスイメージング解析で歯の発生過程を可視化することが可能である。さらに解析技術の改良が必要ではあるが、平行して検討を進めているエナメル芽細胞分化における網羅的な分子レベルの解析と組み合わせることで歯の形成の理解や、未だ実現していない歯再生技術への応用につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate enamel formation, we have generated a mouse model that labels ameloblasts through expression of a fluorescent protein (tdTomato). First, we isolated enamel organ epithelium cells from the mice and successfully cultured on tissue culture dish or in collagen gel. Second, the amelogenin promoter tdTomato mice were mated with Matrix metalloproteinase-20 (MMP20) knockout mice or Mmp20 transgenic (Tg) mice. Mandibulars were dissected from these mice, cleared and observed by light sheet microscopy. Ameloblast layer were impaired in Mmp20 Tg mice. Finally we improved ameloblast timelapse imaging.

研究分野：歯学

キーワード：エナメル芽細胞 イメージング 歯の発生

## 1. 研究開始当初の背景

身体で最も硬い組織を作るエナメル芽細胞の分化やエナメル質の形成機構は、これまで組織学的・生化学的な静的手法で研究されているが、連続的、三次元的、かつ動的な情報が少なく、未だ十分な理解に至っていない。我々はエナメル芽細胞を特異的に蛍光タンパク tdTomato で標識し、赤色に光るマウスの確立に成功した。これにより、*in vivo* 及び *in vitro* のライブイメージング技術を駆使することでエナメル芽細胞のダイナミックな細胞動態や機能の解析や細胞の分離同定が可能となった。

ヒトにおいてエナメル蛋白分解酵素 (MMP20) はエナメル質形成不全症の原因遺伝子の一つであるが、マウス MMP20 の欠損や過剰発現によって細胞間接着の破綻とエナメル芽細胞層の形態異常、エナメル質形成障害が認められる。我々は、エナメル芽細胞が分泌する MMP20 が、オートクライン/パラクライン的に細胞間接着分子である E-, N-cadherin の細胞外ドメインを切断し、複合体をつくる  $\beta$ -catenin の核内移行シグナルを調節することを明らかにしている。MMP20 欠損マウス及び過剰発現マウスとエナメル芽細胞標識マウスを各々掛け合わせ、それぞれのマウスのエナメル上皮細胞の単離培養法やライブイメージング等の解析を行う。

## 2. 研究の目的

種々の遺伝子改変マウスと生体イメージング技術を用い、エナメル質の形成や石灰化機構をエナメル芽細胞の動態やミネラルイオン輸送に着目して *in vivo* 及び *in vitro* 実験系にて明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) エナメル芽細胞を特異的に蛍光標識するマウスからエナメル上皮細胞を単離した。エナメル上皮細胞を tdTomato の蛍光によりソーティングし、tdTomato 陽性細胞と陰性細胞の遺伝子発現を比較した。

(2) エナメル芽細胞の蛍光標識マウスと MMP20 欠損マウス及び過剰発現マウスを各々掛け合わせ、これらマウスの下顎を CUBIC により透明化しライトシート顕微鏡で観察した。

(3) エナメル芽細胞の蛍光標識マウスを *ex vivo* でタイムラプスイメージングを行った。

## 4. 研究成果

(1) エナメル芽細胞が蛍光標識されたマウスからエナメル上皮を単離し、細胞を分離培養した。新しいエナメル上皮細胞の培養細胞を用いた解析法を確立することができた。この方法により単離した tdTomato 陽性のエナメル芽細胞は細胞塊として単離される(図1)。この細胞塊は花びらの様な形をしており、我々はエナメルペタルと呼んでいる。このある程度、生体内の性質を保った状態でゲル中で3次元培養する方法を確立することで、今後、本件研究の目的であるエナメル芽細胞の動態解析に利用できる可能性がある。

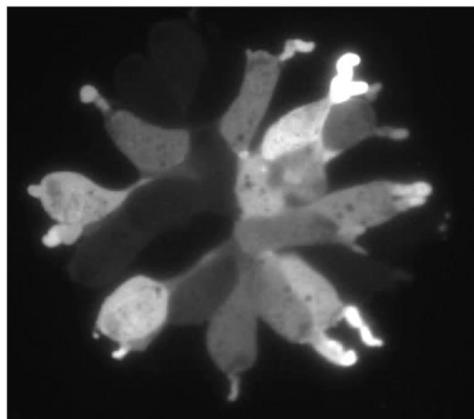


図1 AmelX-Tomatoエナメルペタル

(2) MMP20 欠損マウス及び過剰発現マウスとエナメル芽細胞標識マウスの掛け合わせを行なった。MMP20 はエナメル芽細胞によって分泌され amelogenin 等のエナメル質タンパクを分解するが、細胞間接着分子カドヘリンの細胞外ドメインを切断

し細胞接着・運動に関与することも明らかとなっている。本法により MMP20 発現レベルを調節したエナメル芽細胞の可視化や単離が可能となった。

(3) エナメル芽細胞の配列を3次元的に観察するため、エナメル芽細胞蛍光標識マウスの上顎を透明化しライトシート顕微鏡で観察した。エナメル芽細胞が歯冠に沿って配列するのを3次元で観察することができるようになった。また、MMP20 欠損マウス及び過剰発現マウスについても透明化してそのエナメル芽細胞配列の3次元像を観察することができるようになり、MMP20 過剰発現マウスではエナメル芽細胞の配列が顕著に乱れていることがわかった。

(4) エナメル芽細胞を蛍光標識するマウスを用いてライブイメージングで細胞の挙動を観察する技術の改良を行った。本蛍光標識モデルは細胞1つ1つを蛍光標識できるという特徴があるが、全てのエナメル芽細胞は同一蛍光色に標識される。画像解析ツールを用いて細胞ごとに擬似カラーをつけ、ライブイメージングでエナメル芽細胞の挙動を解析することが可能になった(図2)。この手法によりエナメル芽細胞が切歯の先端方向に集団遊走している現象を観察することが可能になった。

(5)ソートした tdTomato 陽性細胞と陰性細胞の遺伝子発現を比較すると、陽性細胞でエナメル質タンパクの amelogenin、ameloblastin、MMP20 等の遺伝子は陰性細胞と比較し高発現していた。さらに、MMP20 欠損マウス及び過剰発現マウスとエナメル芽細胞標識マウスをそれぞれ掛け合わせた tdTomato 陽性細胞をソートして遺伝子発現を検討した。Lamb3 と Lamc2 の発現がコントロールと比較し MMP20 欠損マウス及び過剰発現マウスでともに上昇することが明らかとなった。



図2 マウス切歯のex vivoライブイメージング  
下顎切歯唇側の観察像。曲線はTomato陽性細胞1個ずつの軌跡を表し、エナメル芽細胞の集団遊走を観察することが可能となっている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Gao Jing, Muroya Ryusuke, Huang Fei, Nagata Kengo, Shin Masashi, Nagano Ryoko, Tajiri Yudai, Fujii Shinsuke, Yamaza Takayoshi, Aoki Kazuhiro, Tamura Yukihiko, Inoue Mayuko, Chishaki Sakura, Kukita Toshio, Okabe Koji, Matsuda Miho, Mori Yoshihide, Kiyoshima Tamotsu, Jimi Eijiro	4. 巻 101
2. 論文標題 Bone morphogenetic protein induces bone invasion of melanoma by epithelial?mesenchymal transition via the Smad1/5 signaling pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1475 ~ 1483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00661-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Akane, Kiyoshima Tamotsu, Yoshizaki Keigo, Nakatomi Chihiro, Nakatomi Mitsushiro, Ohshima Hayato, Shin Masashi, Gao Jing, Tsuru Kanji, Okabe Koji, Nakamura Ichiro, Honda Hiroaki, Matsuda Miho, Takahashi Ichiro, Jimi Eijiro	4. 巻 154
2. 論文標題 Deletion of epithelial cell-specific p130Cas impairs the maturation stage of amelogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116210 ~ 116210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhao Lijuan, Ito Shinichirou, Arai Atsushi, Udagawa Nobuyuki, Horibe Kanji, Hara Miroku, Nishida Daisuke, Hosoya Akihiro, Masuko Rinya, Okabe Koji, Shin Masashi, Li Xianqi, Matsuo Koichi, Abe Shinichi, Matsunaga Satoru, Kobayashi Yasuhiro, Kagami Hideaki, Mizoguchi Toshihide	4. 巻 150
2. 論文標題 Odontoblast death drives cell-rich zone-derived dental tissue regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116010 ~ 116010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 進 正史、岡本 富士雄、鍛冶屋 浩、岡部 幸司
2. 発表標題 成熟期エナメル芽細胞のイオン輸送機構
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 進正史、森志穂美、溝口利英、岡本富士雄、鍛冶屋浩、荒井敦、宇田川信之、岡部幸司
2. 発表標題 チャネルキナーゼTRPM7の骨格形成における発現と軟骨形成制御
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Shin, Shihomi Mori, Fujio Okamoto, Hiroshi Kajiya, Koji Okabe
2. 発表標題 Roles of TRPM7 in tooth development and bone formation
3. 学会等名 KOB & OBT Joint International Symposium 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masashi Shin, Aya Matsushima, Shihomi Mori, Fujio Okamoto, Hiroshi Kajiya, Hidemitsu Harada, John D. Bartlett, Koji Okabe
2. 発表標題 TIME LAPSE IMAGING ANALYSIS OF MOUSE AMELOBLASTS
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福岡歯科大学ホームページ  
https://www.fdcnet.ac.jp/col/index.php

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
研究分担者	岡部 幸司  (Okabe Koji)  (80224046)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授    (37114)	

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