

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11120

研究課題名(和文)革新的な象牙芽細胞回収法を利用して、象牙芽細胞と微小環境の相互作用を解析する

研究課題名(英文) Role of microenvironment on maintenance of odontoblasts: analysis by using novel odontoblast-isolation method

研究代表者

柴田 恭明 (SHIBATA, Yasuaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：80253673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新規象牙芽細胞マーカーTie2を指標として単離した象牙芽細胞分画ならびに、そのディプリーションによって回収された間葉細胞分画との共培養系における同分画の定性解析を行い、両者を比較検討することにより、歯髄微小環境が象牙芽細胞維持に果たす役割を考察した。単離した象牙芽細胞単独培養で観察された象牙芽細胞マーカーの減少は間葉細胞との共培養で抑制された。この結果は歯髄微小環境が象牙芽細胞の分化維持に必須であることを示した。一方で、Tie2リガンドであるAng-1発現をマウスのエナメル器で解析し、Ang-1/Tie2 が象牙芽細胞の分化維持と同時に、エナメル器退縮にも関与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to explore the role of microenvironment in maintenance of odontoblast differentiation. We isolated the odontoblast fraction by using Tie2 and CD31 antibody. Expression of differentiation markers in monoculture of the odontoblasts decreased within 1 week, whereas those were maintained when the odontoblasts was co-cultured with the mesenchymal fraction (Tie2-). These results revealed that the microenvironment of the dental pulp is essential for the maintenance of the odontoblast differentiation. In parallel with the study, we explored the expression of Angiopoietin-1 (Ang-1) in mouse enamel organ. Ang-1 was expressed in enamel organ in associated with the invasion of Tie2-positive capillaries at embryonic day 17. Our result suggested that Ang-1/Tie2 system regulates not only odontoblast differentiation but also involution of enamel organ.

研究分野：顕微解剖学

キーワード：象牙芽細胞 培養 Tie2 Angiopoietin-1 微小環境 エナメル器

1. 研究開始当初の背景

象牙質-歯髄複合体はひとつの機能単位として生涯にわたり代謝活動を営んでおり、その恒常性維持には象牙芽細胞と、その微小環境が中心的役割を果たしている。カリエスのみならず、象牙質溶解を伴わない外傷など、歯髄側の炎症性刺激も象牙質の添加を誘導する所見から、微小環境がむしろ積極的に象牙芽細胞を活性化する機構が提示されている^{1,2)}。その分子機序の解明は、象牙質-歯髄複合体再生に直結すると期待できるが、詳細は不明である。

細胞間相互作用の解析には、明確に分離・同定された細胞群を用いた共培養系が必要であるが、象牙芽細胞回収法は開発されていない。それは、セルソーターや磁性ビーズ回収に使用可能な、象牙芽細胞膜に表出する特異的な抗原が特定されていなかったことに起因する。ゆえにこれまでの解析には主として形質の一部のみを反映する株化細胞や^{3,4)}、多種細胞が混入した全歯髄細胞培養系^{5,6)}を用いるほか方法がなく、生体を反映した象牙芽細胞-微小環境相互作用の詳細な解析には限界があった。結果的に、象牙芽細胞回収に関する技術的な問題は、微小環境との相互作用解析のみならず、より根本的な、象牙芽細胞の定性解析をも阻んできた。我々は、血管内皮細胞に限定して局在するチロシンキナーゼ型受容体 Tie2 が、分化した象牙芽細胞に発現する全く新しいマーカーであることを報告した(歯科基礎医学会 2013、組織細胞化学学会 2014)。そこで、象牙芽細胞マーカー dentin sialophosphoprotein (DSPP) mRNA 量を指標として条件を検討し、Tie2 磁性ビーズを用いた象牙芽細胞回収法を考案した(図1)。すなわち歯髄をコラゲナーゼで処理後、メッシュを通し、Tie2 磁性ビーズを用いて、象牙芽細胞を Tie2 陽性群として分離同定する。さらに CD31 磁性ビーズによる内皮細胞

除去により、最終的に象牙芽細胞 (Tie2+CD31-) のみならず、副次的に歯髄間葉細胞(Tie2-) と血管内皮細胞 (Tie2+CD31+) の同時回収するものである(図1)。本法は、生体をより反映した象牙芽細胞の定性解析ならびに、象牙芽細胞と間葉系細胞の相互作用解析を可能にした、革新的な歯髄細胞の分離・同定法である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、象牙芽細胞の微小環境が象牙質-歯髄複合体の恒常性

を維持するメカニズムを明らかにすることである。申請者は、見出した象牙芽細胞の受容体 Tie2 をマーカーとして、これまで不可能であった、歯髄から象牙芽細胞を生きたまま回収する方法を考案した。本研究ではこれを利用して

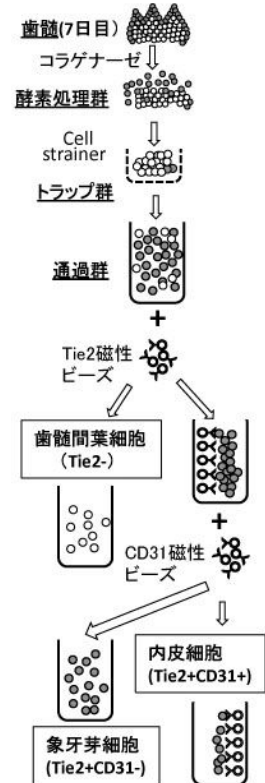
(1) 象牙芽細胞特異的な遺伝子群を同定する一方、同細胞と間葉系細胞の共培養系を利用して、間葉系細胞が、(2) 象牙芽細胞の生存/増殖/分化/アポトーシスならびに(3) 同定された同細胞特異的な遺伝子の発現に及ぼす影響を解明する。

3. 研究の方法

(1)細胞回収(図1)

歯髄細胞回収：胎生 18 日目マウス下顎第一大臼歯から歯髄を摘出し、0.1% EDTA で 37°C で 15 分間処理し、cell strainer を通して single cell とした。Dead cell removal kit にて死細胞を除去したのち、Tie2 抗体+抗ウサギ抗体磁気ビーズ+MS カラムにて

図1 歯髄細胞群の分画



Tie2 + 分画を単離、かつ CD31 抗体 + 磁気ビーズにて内皮細胞分画を除去し象牙芽細胞分画を単離した。他方、Tie2- 分画を間葉細胞分画として単離した。

(2) FACS 解析

単離した細胞群を、抗 Tie2 抗体、抗 CD31 抗体を用いて FACS (BD FACS Calibur) 解析した。二次抗体には Alexa488 または Alexa546 標識抗体を用いた。

(3) PCR 解析

Takara 社の Premix Ex Taq ならびに Thermal Cycler Dice Real Time System Lite を用いた。プローブは Taqman を利用し、Applied Biosystems より購入した。

(4) 細胞培養

10% ウシ胎仔血清を含む DMEM 培地で通法に従い培養した。象牙芽細胞分化誘導には、5 µg/ml ascorbic acid ならびに 1nM -glycerophosphate を用いた。

(5) 免疫染色

マウス下顎を摘出、4% PFA/PBS で一晩固定後、パラフィン包埋した。5 µm 薄切片を作成し、脱パラフィン・脱水後、内因性ペルオキシダーゼを 3% H₂O₂/MetOH でブロックした。1% BSA/PBS でブロッキング後、抗 Tie2 抗体、抗 Ang-1 抗体 で 1 時間反応させた。洗浄後、HRP、Alexa488、Alexa546 標識抗体で 30 分反応させ、HRP は DAB/H₂O₂ で発色した。蛍光観察には LSM (Zeiss) を用いた。

(6) In situ ハイブリダイゼーション

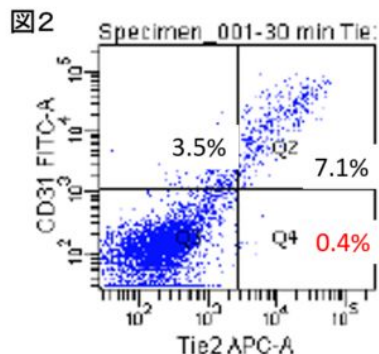
Ang-1 プローブ：マウス歯胚 cDNA を鋳型とした PCR 産物を精製し pGEM-T Easy に組み込み、RNA probe を作成して用いた。

4. 研究成果

(1) 象牙芽細胞の分化維持に関する微小環境の役割 (学会発表、)

新生仔マウス下顎第一大臼歯から摘出した歯胚をコラゲナーゼ処理したのち、抗 Tie2 抗体、ならびに抗 CD31 抗体を用いて、フロー

サイトメトリー解析をおこなった。その結果、Tie2+ 分画は約7%、そのうち象牙芽細胞分画として期待されたTie2+/CD31- 分画は0.4% であり、ほとんどが内皮細胞であること、象牙芽細胞の回収率が極めて悪いことが明らかとなった(図2)。

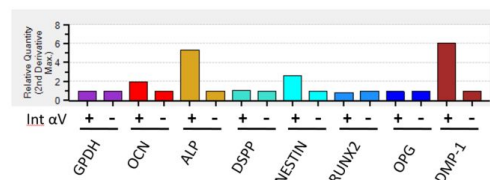


Tie2 が接着装置としての機能が報告されていることを勘案すると、これらの結果は、基質と強固な接着を構築する受容体を利用した象牙芽細胞単離には、極めて穏やかな条件での歯髓の摘出が求められることが示唆された。その対応として、(1)硬組織形成前の、胎性18日目マウス歯胚の利用、ならびに(2)より細胞障害が緩徐と考えられる EDTAにより回収した歯乳頭からの象牙芽細胞回収を試みた。新生仔マウス下顎第1大白歯歯冠から機械的に剥離・回収した歯胚を0.1% EDTAでインキュベートして単離した象牙芽細胞群は、FCM解析では象牙芽細胞分画はこれまでの0.5%から3%へと上昇した。

この細胞群を磁気ビーズで単離した。

Real Time PCR を用いた象牙芽細胞マーカーの発現解析では、アルカリフォスファターゼ、ネスチン、DMP-1の発現が上昇しており、象牙芽細胞分画を単離していることが示唆された(図3)。

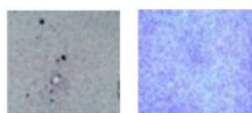
図3



回収された象牙芽細胞分画は培養可能ではあったが、2週までに象牙芽細胞マーカである DSPP や DMP-1 の発現が減少した。一方、象牙芽細胞分画を Tie2-分画(間葉細胞分画)と共培養したところ、APL 活性を含む象牙芽細胞マーカの発現は2週後も維持されており(図4)、象牙芽細胞の分化維持には歯髄の微小環境が必須であることが示された。また、共培養後の細胞群から再度象牙芽細胞分画を単離し、Real Time PCR を用いて象牙芽細胞マーカの発現解析を行った。これらの細胞群は DSPP、DMP-1、OCM、OPN 等の象牙芽細胞マーカを発現しており、今後の微小環境解析に有効であることを示唆した。

図4

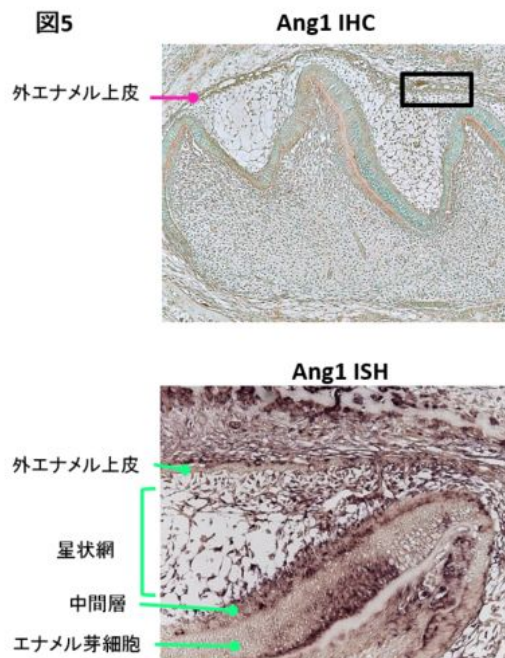
単独培養 共培養



(2) エナメル器退縮におけるAng-1 の役割 (学会発表、)

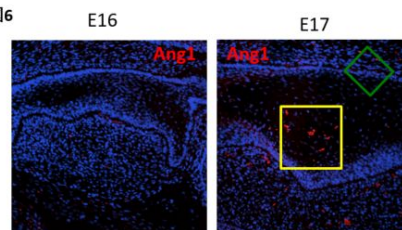
象牙基質の沈着開始と時期をほぼ同じくしてエナメル器へ毛細血管の侵入が始まり、これを契機にエナメル器は退縮する。これは、象牙基質沈着によって途絶されたエナメル芽細胞への歯乳頭側からの血漿成分供給を代償するためと推測されているが、エナメル器への毛細血管侵入を制御する機序については不明である。我々はエナメル器への血管侵入時期にはエナメル器でAng-1 が発現し、Tie-2 陽性血管内皮細胞を誘導すると仮定し、免疫染色・In situ ハイブリダイゼーションによって、エナメル器でのAng-1 の発現を解析した。その結果、Ang1は胎生18日目には外エナメル上皮のみならずエナメル上皮全体に発現すること(図5)、

図5



胎生16日目では確認できなかったTie2 陽性血管が胎生17日目には外エナメル上皮に侵入すること、そして胎生17日目にはすでに赤血球のエナメル髓への浸潤がみられること(図6)、さらに エナメル器へ浸潤した内皮細胞がTie2を発現することを明らかにした(図7)。

図6



E17、部分拡大

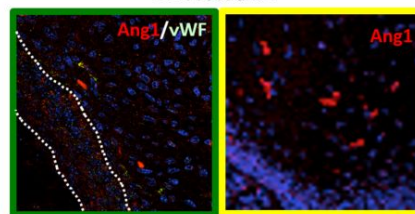
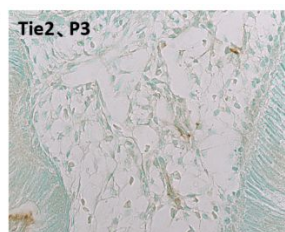


図7



(3) 総括

これらの結果は、象牙芽細胞の分化維持には歯髄の微小環境が必須であること、そして Ang-1/Tie2 が象牙芽細胞の分化維持のみならずエナメル器の退縮にも重要な役割を果たすことが示唆された。

<引用文献>

- 1) Chmielewsky F. J Endod. 40:S19-25, 2014.
- 2) About I. Adv Dent Res 23:320-4, 2011.
- 3) Rodriguez AP Biocell 33:39-47, 2009.
- 4) Kuzynski M. J Biol Chem 289:27481-93, 2014.
- 5) Kim JW. J Dent Res 93:483-9, 2014.
- 6) Woo SH. J Endod 39:801-5, 2013

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 4 件)

Nakajima K, Odatsu T, Shinohara A, Baba K, Shibata Y, Sawase T. Effects of cleaning methods for custom abutment surfaces on gene expression of human gingival fibroblasts. J Oral Sci. 59(4):533-539, 2017 DOI: 10.2334/josnusd.16-0681 査読有

Ahmed GJ, Tatsukawa E, Morishita K, Shibata Y, Suehiro F, Kamitakahira M, Yokoi T, Koji T, Umeda M, Nishimura M and Ikeda T. Regulation and biological significance of formation of osteoclasts and foreign body giant cells in an extraskeletal implantation model. Acta Histochem Cytochem, 49(3); 97-107, 2016 DOI:10.1267/ahc.16007 査読有

Song N, Endo D, Song B, Shibata Y and Koji T. 5-aza-2'-deoxycytidine impairs mouse spermatogenesis at multiple stages through different usage of DNA methyltransferases. Toxicology, 361-362; 62-72, 2016 DOI:10.1016/j.tox.2016.07.005 査読有
Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Shibata Y, Takahashi H, Ikeda T and Koji T. In vivo over-expression of KGF mimic human middle ear cholesteatoma. Eur Arch Otorhinolaryngol, 272(10); 2689-2696, 2015 DOI:10.1007/s00405-014-3237-6 査読有

[学会発表](計 18 件)

Nandar Tun, Myat Thu Soe, Endo, D., Shibata, Y. and Koji, T. (2018) Possible involvement of hypoacetylation of histone H3K9 in estrogen-dependent transdifferentiation of LH cells to PRL cells in male mouse pituitary. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会
Myat Thu Soe, Shibata, Y., Nandar Tun, Endo, D. and Koji, T. (2018) Population kinetics of Sox9 positive liver progenitor cells in normal and iron-overloaded rat liver: Effects of partial hepatectomy. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会
遠藤大輔・柴田恭明・小路武彦 (2018) 減数分裂に於ける染色体動態の超解像顕微鏡による解析: DNA メチル化の影響. 日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会(久留米) (ワークショップ)

Nandar Tun, Myat Thu Soe, Endo, D., Shibata, Y. and Koji, T. (2018) Possible involvement of hypoacetylation of histone H3K9 in estrogen-dependent transdifferentiation of LH cells to PRL cells in male mouse pituitary. 46th Myanmar Health Research Congress, Yangon, Myanmar.
Myat Thu Soe, Shibata, Y., Kyaw Soe, Nandar Tun, Endo, D. and Koji, T. (2018) Population kinetics of Sox9 positive liver progenitor cells in normal and iron-overloaded rat liver: Effects of partial hepatectomy. 46th Myanmar Health Research Congress, Yangon, Myanmar.

遠藤大輔・柴田恭明・小路武彦 (2017) マウス精母細胞に於ける DNA メチル基転移酵素による染色体ダイナミクスの制御. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会

柴田恭明・中島和慶・遠藤大輔・池田通・小路武彦 (2017) 象牙芽細胞分化およびエナメル器退縮における

Angiopoietin-1/Tie2 の役割. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会
瓜生泰恵・遠藤大輔・柴田恭明・小路武彦 (2017) 電気穿孔法を用いた顆粒膜細胞標識による卵管上皮内顆粒膜細胞様細胞の由来の解析. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会

Nandar Tun, Myat Thu Soe, Endo, D., Shibata, Y. and Koji, T. (2017) Possible involvement of hypoacetylation of histone H3K9 in estrogen-dependent transdifferentiation of LH/FSH cells to PRL cells in male mouse pituitary.

第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会

Myat Thu Soe, Nandar Tun, Endo, D., Shibata, Y. and Koji, T. (2017) Changes in DNA methylation level during liver regeneration after partial hepatectomy in normal and iron-overloaded rats. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会

柴田恭明・中島和慶・遠藤大輔・池田通・小路武彦 (2017) 歯冠形成における Angiopoietin-1 および Tie2 の役割. 第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会

柴田恭明・遠藤大輔・小路武彦 (2017) マウス精子形成細胞核における PGK 遺伝子座の分布変化と mRNA 発現解析 - In situ PCR 並びに In situ ハイブリダイゼーションを用いて -. 第 58 回日本組織細胞化学学会総会・学術集会 (ワークショップ)

遠藤大輔・柴田恭明・小路武彦 (2017) マウス精母細胞に於ける Dnmt1 発現抑制が共局在因子の核内発現に及ぼす影響の解析. 第 58 回日本組織細胞化学学会総会・学術集会

柴田恭明・中島和慶・池田通・小路武彦 (2016) 象牙芽細胞マーカーを利用した単離の試み. 日本顕微鏡学会第 72 回学術講演会

柴田恭明・中島和慶・遠藤大輔・池田通・小路武彦 (2016) エナメル器退縮と Angiopoietin-1. 第 57 回日本組織細胞化学学会総会・学術集会

柴田恭明・中島和慶・池田通・小路武彦 (2016) 象牙芽細胞単離: Tie2 ならびにインテグリンを利用したトライアル. 第 48 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会

瓜生泰恵・遠藤大輔・柴田恭明・小路武彦 (2016) 電気穿孔法を用いた卵巣特異的 GFP 発現ベクター導入による卵管上皮内顆粒膜細胞様細胞の由来の解析. 第 48 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会

遠藤大輔・柴田恭明・小路武彦 (2016) マウス精母細胞に於いて染色体動態を制御する Dnmt1 と共局在する核内因子の解析. 第 48 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会

〔図書〕(計 1 件)

柴田恭明 (2017) In situ hybridization 法 [組織細胞化学 2017] (日本組織化学会編) 中西印刷、京都、pp, 171-181

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 恭明 (SHIBATA, Yasuaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号: 80253673

(2) 研究分担者

中島 和慶 (NAKAJIMA, Kazunori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 40707246

(3) 研究分担者

池田 通 (IKEDA, Tohru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 00211029