

令和元年6月5日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17100

研究課題名(和文)新規エナメル芽細胞解析法を用いたMMP20-低分子量G蛋白/細胞骨格系の解明

研究課題名(英文)Elucidation of ameloblast MMP20-Rho-actin axis

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯のエナメル質は生体内で最も硬い構造物であり、エナメル芽細胞によって形成される。本研究によりエナメル芽細胞を蛍光標識するマウスの作製に成功した。この動物モデルを使うことにより、エナメル芽細胞を周囲組織から単離して解析することができるようになった。さらに、ライブイメージング技術により生きたままのエナメル芽細胞の生体内での動きを観察することも可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ライブイメージングで蛍光標識された個々のエナメル芽細胞を観察することができるようになったので、今後、この方法によって生きたままの細胞の細胞間接着や細胞骨格の詳細な解析が可能になる。また、エナメル芽細胞におけるミネラルイオン輸送機構の解明にも応用し、歯の石灰化メカニズムの解明にも利用できる。これらの取組みは、歯の発育障害の病態解明や歯の再生に向けた新しい戦略になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Enamel is a very hard tissue in the human body and is formed by cells known as ameloblasts. Here, we generated a mouse model that labels ameloblasts through expression of a fluorescent protein (tdTomato) controlled by the amelogenin promoter. 1) Histological sections demonstrated that ameloblasts were tdTomato positive. The highest expresser was greatly fluorescent and was detected in ameloblasts through the skin of mandibular incisors in living juvenile mice. 2) Molar and incisor explants were monitored for fluorescence with live imaging. 3) The enamel organ epithelium was dissected from mouse incisors, trypsinized and tdTomato positive cells were successfully sorted. This may be a useful tool to better understand ameloblast maturation and intracellular signaling.

研究分野：歯学

キーワード：エナメル芽細胞 エナメル質形成 細胞間接着 細胞骨格 タンパク質分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯のエナメル質は上皮系細胞であるエナメル芽細胞によって作り出される。エナメル芽細胞はエナメル質形成の段階で様々な分子機構を有し、細胞形態や遺伝子発現が劇的に変化する。また、エナメル芽細胞の周囲には象牙芽細胞、歯髄細胞、中間層細胞などが存在しエナメル芽細胞だけを単離することが難しくその機能解析が困難である。

2. 研究の目的

(1) エナメル芽細胞を特異的に蛍光標識する実験系を確立し、エナメル質形成のメカニズムを解明する。

(2) さらに、この技術を用いてエナメル質タンパクを分解し脱却する Metalloproteinase-20 (MMP20) と低分子量 G 蛋白シグナルのエナメル芽細胞の細胞間接着や細胞骨格における分子機構の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) エナメル質タンパクのアメロジェニン遺伝子のプロモーター下流に蛍光タンパク質 tdTomato を挿入することにより、エナメル芽細胞を蛍光標識するマウスを作製した。

(2) 作製したエナメル芽細胞蛍光標識マウスと Mmp20 欠損マウス、Mmp20 過剰発現マウスをそれぞれ交配しその歯牙を解析した。

4. 研究成果

(1) アメロジェニン遺伝子のプロモーター下で tdTomato を発現するマウスを 2 系統得ることに成功した。蛍光発現量の比較的高い 1 ラインは蛍光を皮膚を通して確認できる程非常に強い光度をもっていた。

(2) アメロジェニン-tTomato(AT)マウス頭蓋の凍結切片を作製・観察すると分泌期から成熟期前期にかけてのエナメル芽細胞に赤色蛍光シグナルがみられた。周囲の象牙芽細胞、歯髄細胞、中間層細胞にその蛍光は認められず、エナメル芽細胞に特異的に tdTomato が発現していることが確認された。

(3) AT マウスの第一大臼歯および切歯を摘出し、explant イメージングで観察したところ、エナメル芽細胞の局在をライブで可視化することができた(図1)。

(4) AT マウスのエナメル上皮細胞を摘出し、トリプシン処理後、ソーティングにより蛍光標識された細胞だけを分画することができた。組織学的にエナメル芽細胞が特異的に蛍光標識されることが示されているので、分画

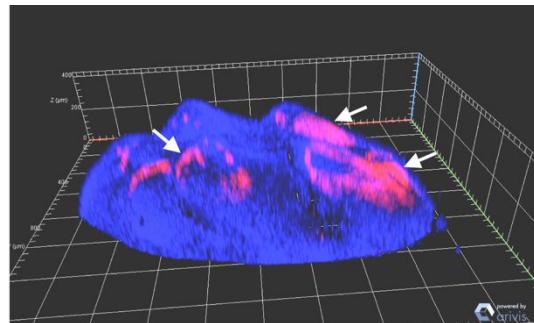


図1 エナメル芽細胞の生体イメージング
臼歯の歯冠部。矢印でAmelX-Tomato(+)を示す。

された細胞はエナメル芽細胞とみなすことができる。すなわち、マウスのエナメル芽細胞を周囲の細胞から単離し、解析することがはじめて可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Shin M., Chavez M.B., Ikeda A., Foster B.L., Bartlett J.D., MMP20 Overexpression Disrupts Molar Ameloblast Polarity and Migration. Journal of Dental Research, 査読有 2018, 97 (7)820-827. doi:10.1177/0022034518758657

〔学会発表〕(計4件)

進 正史、岡本 富士雄、鍛冶屋 浩、原田 英光、岡部 幸司、マウスエナメル芽細胞の新規標識・分取法、第60回歯科基礎医学会学術大会、2018年

進 正史、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、間葉系細胞由来 TRPM7 による骨格形成制御、第36回日本骨代謝学会学術集会、2018年

進 正史、岡本 富士雄、鍛冶屋 浩、岡部 幸司、TRPM7 によるエナメル質形成制御、第69回西日本生理学会、2018年

進 正史、緒方 佳代子、圓谷 智之、岡 暁子、岡本 富士雄、鍛冶屋 浩、片桐 千秋、尾崎 正雄、松下 正之、岡部 幸司、エナメル質形成における TRPM7 のキナーゼ活性とチャネル機能の意義、第95回日本生理学会大会、2018年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：ジョン D. バートレット

ローマ字氏名：John D. Bartlett

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。