

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890208  
 研究課題名(和文) 象牙芽細胞の形態変化、移動に関わる Rho シグナリングの機能解析  
 研究課題名(英文) Functional analysis of Rho signaling in morphological change and migration of odontoblasts

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)：

歯の発生過程において、未分化間葉細胞が象牙芽細胞に分化し、象牙質を形成する際の細胞の形態変化、細胞内分子動態をリアルタイムで観察できる培養撮影技術を確立した。歯胚間葉細胞から象牙芽細胞マーカー陽性細胞をクローニングし、象牙芽細胞株を樹立した。この細胞株とマウス切歯の器官培養を用い、低分子 GTPase Rho のエフェクター分子である ROCK が象牙芽細胞の極性形成、象牙質形成に重要な働きをしていることを示した。

## 研究成果の概要(英文)：

We have developed a new system that can observe the morphological change and molecular dynamics in a single cell during odontogenesis. We have established odontoblasts cell line from tooth germ mesenchymal cells with odontoblast marker. Using the cell line and mouse incisor organ culture, we demonstrated that ROCK, an effector molecule of Rho small GTPase, plays an important role for the polarization and odontogenesis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

## 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：発生・分化、歯学、細胞・組織、シグナル伝達、象牙芽細胞、歯胚発生、Rho シグナリング、real time imaging

## 1. 研究開始当初の背景

歯の発生過程において、歯乳頭細胞から分化した象牙芽細胞が象牙質を形成する際、細胞核は歯乳頭側へと移動して、細長い円柱状の細胞へと形態を変

える。その後、象牙芽細胞突起を基底膜側に伸ばしながら次第に歯髓中心側へと移動していく。しかし、この象牙芽細胞に生じる一連の変化(形態や極性の変化、移動)を制御する細胞内分子調節機構に

関しては未だ不明な点が多く、これらを解明することは歯の発生機構のさらなる理解や歯の再生研究において非常に重要である。

この数年間で、細胞の形態と運動を司る細胞のダイナミクスに関する研究は著しく発展してきた。例えば上皮細胞、線維芽細胞、神経細胞において、Rhoファミリータンパク質 (Rho, Rac1, Cdc42 など) とその下流のエフェクター分子がアクチン骨格や微小管の重合の調節を介して細胞の形態や極性の変化、移動などを担っていることが報告されている。ここで我々は特に脳の発生過程において見られる神経細胞の移動という現象に着目した。この現象は、移動方向の前後に突起を形成しながら行われ、象牙芽細胞がその突起を伸ばしながら歯髄内を移動する様とよく類似している。また、象牙芽細胞は神経細胞と同じ神経外胚葉由来であり、我々は、ネスチンやβ III チューブリンなどの神経細胞マーカーが象牙芽細胞においても発現していることを示してきた。また我々の予備的な実験では、マウス歯胚から分離、株化した培養歯乳頭細胞 (mNeur) に Rho のエフェクター分子である Rho キナーゼ (ROCK) の阻害薬 (Y-27632) を作用させると、細胞の形態、凝集能が変化することが観察された (図 1)。このことは、Rho ファミリータンパク質が象牙芽細胞の形態変化、細胞移動に強く関与していることを示唆している。

以上のことから、我々は象牙芽細胞が神経細胞同様、Rho ファミリータンパク質を介する細胞内シグナル伝達機構を持ち、これが細胞の形態や極性の変化、移動を調節することで、象牙質形成を制御していると仮説を立てた。

今回、この仮説を実証し、象牙芽細胞の分化、象牙質形成に関わる新たな細胞内調節機構を解明するために、従来から行われてきた研究手法に加え、*in vitro*、*in vivo* 双方からの多面的な解析、そして、より生体内の環境に近い状態で、単一細胞内の現象を時間的空間的に可視化する新たな実験法の確立が重要な課題であると考え、本研究計画を申請した。

## 2. 研究の目的

- (1). 象牙芽細胞における形態や極性の変化、細胞移動のダイナミクスが観察可能な Slice culture 培養法、リアルタイム撮影の至適条件を明らかにする。

- (2). Rho ファミリータンパク質の機能獲得、喪失実験によって象牙芽細胞内において Rho ファミリータンパク質がどのように形態や極性の変化、細胞移動を調節しているかを明らかにする。
  - (3). 我々がすでに分離、維持している歯乳頭由来の細胞株 (mNeur) から象牙芽細胞マーカー陽性細胞をクローニングし、象牙芽細胞株を樹立する。そしてこの細胞株における Rho ファミリータンパク質を介した細胞内シグナル伝達機構を明確にし、*in vitro* での更なる基礎的データの集積を行う。
  - (4). Slice Culture、細胞培養の系で示された結果を、従来の歯胚器官培養法を用いて得られた結果と比較し、評価を行う。
  - (5). Rho ファミリータンパク質遺伝子改変動物を入手し、その歯胚における歯胚の形態、象牙質形成、象牙芽細胞の形態や極性、その他 Rho ファミリータンパク質下流のシグナル分子の発現について上記と同様な方法で比較検討する。
- 以上の結果から、*in vivo*でのRhoファミリータンパク質の象牙芽細胞内での機能、象牙質形成における役割を明確にする。

## 3. 研究の方法

### (1). GFPマウスを用いた象牙芽細胞観察のためのslice culture培養法の確立

胎生 17 日から生後 5 日までの GFP マウス下顎より切歯または臼歯を摘出し、寒天、ゼラチン、コラーゲンゲルなどの包埋在中に包埋、ビブラトームにより 100-300・m の切片を作製した。切片をガラスボトムディッシュにのせ、培地を加えた後、細胞培養用チャンバーの設置された共焦点顕微鏡にて経時的に細胞動態を観察し、観察に際しての実験条件の最適化を行った。

### (2). 象牙芽細胞株の樹立

歯乳頭由来細胞株 (mNeur) から象牙芽細胞マーカーであるネスチン陽性細胞をクローニングシリンダーを用いてクローニングした。

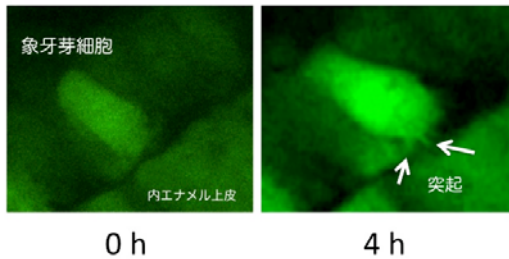
### (3). 器官培養を用いたRhoシグナリングの機能的検索

胎生 17 日から生後 5 日までのマウス下顎切歯を Trowell 法にて器官培養し、Rho シグナリングにかかわるキナーゼ ROCK の inhibitor (Y27632) を作用させ、象牙質形

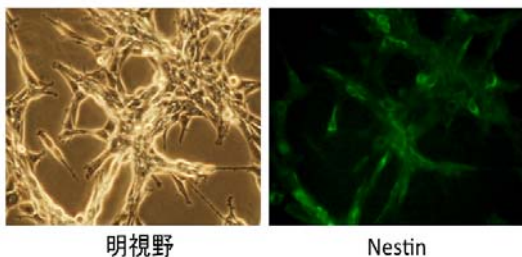
成、象牙芽細胞の形態など組織学的な変化を観察した。

#### 4. 研究成果

- (1). 様々な条件を検討した結果、1. 試料はマウス下顎切歯形成端部、2. スライス thickness は 200  $\mu$ m、3. 包埋剤は低融点アガロース、4. 画像取得条件は 60 倍油浸レンズにて 10 分インターバル、37°C 5%CO<sub>2</sub> ガス流入下で観察することがこの実験系において最適であることが分かった。これらの条件で実験を行い、形成端付近の未分化間葉細胞が、細胞体を伸張させ、象牙芽細胞突起をもつ象牙芽細胞に分化して行く様子を観察することに成功した (fig.)。現在は、この slice culture した象牙芽細胞に ROCK inhibitor 処理、または ROCK dominant negative をトランスフェクションしその効果を検討している。

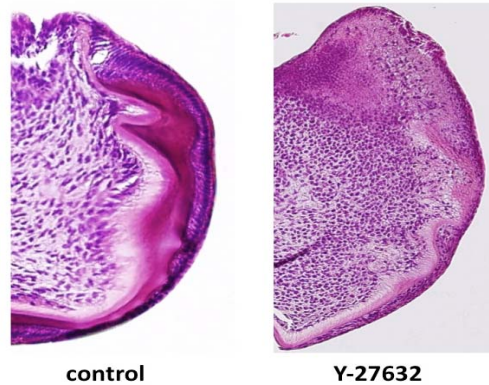


- (2). 歯胚歯乳頭細胞より樹立した細胞株 (mNeur) のコロニーをクローリングで分離、回収し他の容器に移し培養を行った。その中のクローンから 90% 以上の細胞が nestin 陽性であるものを選び、培養を続け nestin 陽性象牙芽細胞株を樹立した (fig.)。また、この細胞株に ROCK inhibitor を加えたところ、細胞形態がより紡錘形に変化することが観察され、この現象は細胞骨格を司る actin の形成変化によるものであることが明らかとなった。現在は 1) 同様、ROCK inhibitor 処理、ROCK dominant negative のトランスフェクションを行い、その他の効果をタンパク質、RNA レベルで検討している。
- (3). マウス下顎切歯を Trowell 法にて器官



培養を行い、ここに ROCK inhibitor を作用させたところ、形成端部象牙芽細胞がエナメル芽細胞と共に極性を失い、象牙質形成が抑制されることが分かった (fig.)。現在はこの試料に対し象牙芽細胞

マーカー、その他 Rho シグナル関連タンパクの免疫染色を行い、更に詳しいメカニズムの解析を行っている。



#### 研究成果のまとめ

以上の結果から、象牙芽細胞の極性変化、移動、象牙質形成に対して Rho シグナルが細胞骨格形成を調節することにより、重要な働きを担っていることが示唆された。また本研究課題にて確立された slice culture 法を用いることにより、さらに詳細な象牙芽細胞分化、象牙質形成メカニズムが解明できる可能性が示された。

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 3 件)

- (1) Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. Keishi Otsu, Shonit Das, Sandra D. Houser, Sadiqa K. Quadri, Sunita Bhattacharya, Jahar Bhattacharya, Blood, 113, 2009, 4197-4205, 査読有り
- (2) Expression of osteogenic proteins during the intrasplenic transplantation of Meckel's chondrocytes: A histochemical and immunohistochemical study, Kiyoto Ishizeki, Tadayoshi Kagiya, Naoki Fujiwara, Keishi Otsu, Hidemitsu Harada, Arch Histol Cytol, 72, 2009, 1-12 査読有り
- (3) Reduction of Egf signaling decides transition from crown to root in the development of mouse molars, Naoki Fujiwara, Tadashi Akimoto, Keishi Otsu, Tadayoshi Kagiya, Kiyoto Ishizeki, Hidemitsu Harada, 312B, 2009, 486-494 査読有り

[学会発表] (計9 件)

- (1) 大津圭史、原田英光：間葉系幹細胞と血管内皮細胞との相互作用 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 3/30、2010 (岩手)
- (2) 大津圭史、石関清人、鍵谷忠慶、藤原尚樹、原田英光：歯の再生を目的としたiPS細胞の上皮、間葉細胞への分化誘導と分離培養 第114回日本解剖学会総会・全国学術大会 3/28-3/30、2009 (岡山)
- (3) 藤原尚樹、大津圭史、秋元 義、鍵谷忠慶、石関清人、原田英光：歯胚組織中の細胞動態を観察するためのimaging systemの開発 第114回日本解剖学会総会・全国学術大会 3/28-3/30、2009 (岡山)
- (4) 鍵谷忠慶、秋元 義、大津圭史、藤原尚樹、石関清人、原田英光、吉田康夫、平 雅之：銅イオンのマクロファージへ及ぼす細胞障害作用について 第114回日本解剖学会総会・全国学術大会 3/28-3/30、2009 (岡山)
- (5) 大津圭史、藤原尚樹、石関清人、鍵谷忠慶、佐々木憲明：Rho キナーゼによるエナメル芽細胞の極性制御機構 第51回歯科基礎医学会学術大会 9/10-11、2009 (新潟)
- (6) 石関清人、大津圭史、鍵谷忠慶、藤原尚樹、原田 英光：GFPマウスを用いたメッセル軟骨細胞の形質転換のイメージング解析 第51回歯科基礎医学会学術大会 9/10-11、2009 (新潟)
- (7) 原田英光、石関清人、大津圭史、鍵谷忠慶、藤原尚樹：ヘルトヴィッチ上皮鞘形成過程におけるサービカルループでの細胞動態 第51回歯科基礎医学会学術大会 9/10-11、2009 (新潟)
- (8) Naoki Fujiwara, Keishi Otsu, Hidemitsu Harada, Stimulation of root formation and regeneration by a natural compound, 85<sup>th</sup> Congress of the European Orthodontic Society, 6/10-14, 2009, (Finland)
- (9) 藤原尚樹、大津圭史、秋元 義、鍵谷忠慶、石関清人、原田英光：歯冠から歯根形成への移行過程におけるEGF signalingの役割、第50回歯科基礎医学会学術大会、9/23-25、2008 昭和大学 (東京)

[その他]

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 (OTSU KEISHI)

岩手医科大学・歯学部・ポストドクター

研究者番号：60509066

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：