

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592695

研究課題名(和文)エナメル芽・象牙芽前駆細胞株のスフェロイド共培養による組織成熟機構の研究

研究課題名(英文)A novel three-dimensional spheroid culture using the ameloblast-lineage cells and the odontoblast-lineage cells for studying maturation in developing tooth germ.

研究代表者

小代田 宗一 (Koyota, Souichi)

秋田大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：80400480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスエナメル芽前駆細胞株ALCと象牙芽前駆細胞株OLCを用いて歯胚形成の成熟過程を解析するための3次元培養モデルの構築を検討した。ALCとOLCのそれぞれに大きさの異なるスフェロイドを形成させた後に互いに融合させて培養する方法を開発した。その結果、スフェロイド培養において2種の前駆細胞を広範囲で接触させると組織全体が著しく石灰化すること、スフェロイドを一部分のみ接触させた場合、上皮細胞の一部が間葉組織に陥入することを見出した。この培養組織で細胞分化マーカーおよび細胞分化シグナル経路の遺伝子発現変化を解析することができた。

研究成果の概要(英文)：A novel three-dimensional spheroid culture method was developed using the ameloblast-lineage cells (ALC) and the odontoblast-lineage cells (OLC) for studying maturation in developing tooth germ. In the method, the spheroid of ALC and that of OLC fused together so that the tissue of epithelial ALC and that of mesenchymal OLC be concentrated and closed expecting to initiate epithelial-mesenchymal interaction. Results from spheroids culture showed that fusions in wide area of the tissue of ALC and that of OLC experienced significant mineralization in whole of construct when compared to their limited small area exhibiting invagination-like processes of epithelial cells. Expression analyses of the genes of differentiation markers and of those in differentiation signal pathways in the spheroid cultures were performed.

研究分野：形態系基礎歯科学

キーワード：エナメル芽前駆細胞 スフェロイド培養 上皮間葉相互作用 歯胚 歯胚形成 象牙芽前駆細胞 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

歯の再生が必要な患者は、歯の原基である歯胚が失われている場合が多く、そのため歯の再生医療の確立には安定供給可能な歯胚細胞の樹立と、歯胚細胞に歯胚形成を行わせるための培養技術の開発が必要である。申請者らはこれまでに、1) マウス胎児歯胚上皮より、エナメルマトリックスを産生するエナメル芽前駆細胞を単離し、細胞株(ALC)として樹立した(BBRC 2003, vol.308, pp.834-839, 特開 2005-220106)。ALCは培養液を低カルシウム濃度のSMEMから通常濃度のDMEMに変えるだけでも石灰化が見られ、TGFの添加により促進されることがわかった。2) マウス胎児歯胚間葉組織より象牙基質を産生する象牙芽前駆細胞を単離し、細胞株(OLC)として樹立した(BBRC vol.342, pp.718-724, 2006, 特開 2007-209244)。OLCはアスコルビン酸、デキサメタゾンなどの石灰化誘導培地のほか、神経成長因子(NGF)の添加によって分化誘導され石灰化することがわかった(J.Cell.Biochem vol.106, pp.539-545, 2009)。さらにOLCをマウス胎児歯胚の上皮部分のみを分離した組織片と共にコラーゲンゲルに包埋し、マウス腎臓皮膜の中に移植して歯胚を形成させることに成功した(BBRC vol.381, pp.84-89, 2009)。

このように歯胚形成に必要な上皮および間葉系の細胞の両方を樹立して歯胚形成につながる上皮間葉相互作用を研究している例は他になく、均質で大量の培養が可能な細胞株による歯再生のための新しい培養法の開発が期待された。

2009年、辻らによってマウス胎仔歯胚から酵素処理により分散させた全細胞集団をコラーゲン中に凝集し培養すると再び歯胚が形成される結果が報告された(Ikeda et al. PNAS vol.106, pp.13475-13480, 2009)。これは、歯胚の上皮細胞と間葉系の細胞群を高濃度にして共培養すると in vitro でも上皮間

葉相互作用が起きて歯胚形成過程が進むことを示すものであった。この報告をきっかけにして、申請者らはエナメル芽前駆細胞株 ALC と象牙芽前駆細胞株 OLC を用いて 3 次元共培養により上皮間葉相互作用を誘起して歯胚形成に進ませることができないか検討した。

3) これまでコラーゲン塗布した培養皿に 2 種の細胞をただ混ぜて共培養しても、石灰化などの変化を起こすことはできなかった。そこで辻らの研究結果を参考に OLC をコラーゲンゲル内に高密度に培養し、その表面に ALC を播種して培養したところ、著しい石灰化を観察した(“マウスエナメル芽細胞前駆細胞と象牙芽細胞前駆細胞の共培養による石灰化促進” 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 神戸)。この結果から、高密度の培養条件が上皮間葉相互作用の誘起に有効であると考え、実際の歯胚形成前や形成中の組織を模倣する 3 次元培養を着想し、培養法の検討を進めた。

2. 研究の目的

歯胚は上皮組織と間葉組織の間のシグナルのやりとりにより分化が誘導され形態が形成される。しかし、そのメカニズムについては明らかになっていない点が多い。本研究では申請者らが樹立した上皮由来エナメル芽前駆細胞 ALC と間葉由来象牙芽前駆細胞 OLC を用いて、歯胚形成前や形成中の組織を模倣する 3 次元培養法を検討することで歯胚形成における組織の成熟を再現しそこで起こる上皮間葉相互作用の機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

申請者らが独自に樹立した上皮由来エナメル芽前駆細胞 ALC と間葉由来象牙芽前駆細胞 OLC を用いて、歯胚形成前や形成過程におけ

る組織中の「歯胚上皮-間葉細胞の空間配置」を模倣する3次元培養法を検討する。GFP発現マウス由来のOLCは蛍光顕微鏡下で緑色蛍光を発するので、ALCを赤色蛍光化合物で標識してOLCと区別して観察できるようにした。Type Iコラーゲンをを用いたコラーゲンゲル内高密度培養法、極低接着性培養器を用いたスフェロイド培養法を組み合わせる3次元培養を行い上皮由来ALCと間葉系由来OLCによって構築される組織を経時的に観察する。3次元培養組織において分化誘導する部位特異的に発現する遺伝子の探索を行なう。特異的遺伝子発現解析においては、スフェロイド培養組織の連続切片を作製し、細胞の形態や、各種マーカー分子の抗体染色で陽性をしめす部位の解析などから細胞相互作用部位を推定し、Realtime PCR、マイクロアレイ解析などにより遺伝子発現解析をおこない、相互作用特異的遺伝子を探索する。

4. 研究成果

[平成23年度]

「歯胚上皮-間葉細胞の空間配置」を模倣するスフェロイド-コラーゲンゲル内培養の検討し、スフェロイド-コラーゲンゲル培養による歯胚3次元培養組織の構築を行なった。

細胞接着性を抑えたU底培養プレートを用いてそれぞれの細胞でスフェロイドを作製した。この2つのスフェロイドを同一ウェルに入れて培養するとスフェロイド同士が融合し、上皮-間葉系相互作用が惹起されると考えられた。しかし、ALCがOLCスフェロイドの表面を覆うように増殖した時に組織全体に著しい石灰化が起きてしまい歯胚組織の形成には至らなかった。そこでALCとOLCの比率を検討し、OLCをあらかじめコラーゲンゲル中に分散して培養し、細胞数とサイズを大きくしたスフェロイドを作製し、サイズの小さいALCスフェロイドと融合させた。その結果、培養5日後

にはALCがOLCのスフェロイドの内部に移動している様子が観察された。組織の切片の観察から、ALCがOLCのスフェロイドの中へ移動する現象に伴って、細胞外マトリックス様の構造物が作られていることがわかった。HE染色からは明確な象牙質、エナメル質の形成までは確認できなかったが、3次元培養で想定したエナメル芽前駆細胞の陥入に類似の現象とそれに伴う細胞外マトリックス様構造が培養組織中に観察されたことで、歯胚発生過程の一部を再現できる可能性を示した。

[平成24年度]

前年度に開発したALCとOLC両細胞のスフェロイドを一部分のみ接触させる培養法をさらに検討した。石灰化が組織全体で起こる様な激しい変化を抑制し、上皮細胞の一部が間葉組織に陥入するような状況を3次元培養で行う手法は確立できたが、上皮の陥入様現象後の歯胚形成に類似するような形態的变化はそれ以上見出せなかった。培養器中で進展する組織形成の成熟の解析として各種細胞分化マーカーおよび細胞分化シグナル経路の遺伝子発現変化を解析した。その結果、前駆細胞ALC（上皮）では、組織の石灰化や骨芽細胞への分化に関与するTGF β シグナルのうちBMP経路のBMP4およびsmad1/5/8の発現が増加し、TGF β 、TGF β レセプターI、smad2/3の発現が増加していた。一方、前駆細胞OLC（間葉）ではBMP4の発現は抑えられ、BMP8aの発現が増加していた。また、TGF β シグナルの制御に関与するWntシグナル経路や種々の細胞接着分子の発現が両細胞で増加していることがわかった。

[平成25-26年度]

3次元培養組織において分化誘導する部位特異的に発現する遺伝子の探索を行なった。スフェロイド培養組織の連続切片を作製し、細胞の形態や、各種マーカー分子の抗体染色で陽性をしめす部位の解析などから細胞相互

作用部位を推定し、Realtime PCR、マイクロアレイ解析などにより遺伝子発現解析をおこなう予定であったが、スフェロイド培養組織の中で組織形成が進むと切片の作製が難しくなり、抗体染色やマイクロダイセクションによる遺伝子解析試料調製が予定通りにできなかった。培養組織内部で石灰化が部分的に進行するためと考え、スフェロイド培養組織において部分的石灰化が始まる直前の遺伝子発現解析を行うように変更した。前年度の細胞分化シグナル経路の遺伝子発現変化について解析をつづけて、培養組織で新たにWnt5aの発現が上昇していることを見出した。Wnt5aは大腸のクリプト再生に関与することが報告されている。

組織培養からの経時的な細胞採取と特異的遺伝子発現解析実験、および、3次元培養組織の染色など抗体試薬を使用した組織形成の解析実験を現在も継続中である。

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. Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, Biscocho J, Neahring L, Kwei KA, Qu K, Gong X, Ng T, Jones CD, Varma S, Odegaard JI, Sugiyama T, Koyota S, Rubin BP, Troxell ML, Pelham RJ, Zehnder JL, Beachy PA, Pollack JR, West RB. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. Nat Genet. 46, 722-725, 2014
2. Hirose, N., Shimazu, A., Watanabe, M., Tanimoto, K., Koyota, S., Sugiyama, T., Uchida, T. and Tanne, K. Ameloblastin in Hertwig's epithelial root sheath regulates tooth root formation and development. PLOS ONE, Volume 8(1): e54449, 2013
3. Yusa K, Yamamoto O, Fukuda M, Koyota S, Koizumi Y, Sugiyama T. In vitro prominent bone regeneration by

release zinc ion from Zn-modified implant. Biochem Biophys Res Commun. 412, 273-278, 2011

〔学会発表〕(計 1件)

1. 遊佐和之, 山本修, 福田雅幸, 小泉幸央, 小代田宗一, 杉山俊博: "亜鉛修飾型インプラントの骨接着性および骨芽細胞誘導に関する検討" 第19回秋田応用生命科学研究会 2011年11月 秋田市

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小代田宗一(KOYOTA SOUICHI)
秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター分子医学部門・准教授
研究者番号: 80400480

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし