

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861741

研究課題名(和文)エナメル芽細胞および中間層細胞の分化維持因子の新規探索

研究課題名(英文)The novel exploration of the factors for maintaining the function of ameloblasts and stratum intermedium during mouse enamel formation

研究代表者

中富 満城 (NAKATOMI, MITSUSHIRO)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10571771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：将来的に歯の再生を実現する為には正常な歯の発生メカニズムの正確な理解が不可欠であるが、未解明な点が多く残されている。本研究においては歯の発生に關与するMsx2遺伝子に着目し、そのノックアウトマウスを用いて解析した。歯のエナメル質を形成するエナメル器はエナメル芽細胞、中間層細胞、外エナメル上皮等により構成される。本研究の成果によりエナメル芽細胞および中間層細胞が正常な機能を果たす為には外エナメル上皮の角化重層扁平上皮化の抑制が不可欠であり、Msx2がその抑制機構に必須の因子である事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It is important to elucidate the detailed mechanisms of normal tooth development to realize tooth regeneration in the future. We found that the outer enamel epithelium (OEE) became keratinized stratified squamous epithelium (SSE) during enamel formation in Msx2 knock-out mice leading to the loss of function of ameloblasts and subsequent enamel hypoplasia. Our data suggest that Msx2 plays a critical role for inhibiting the transformation of the OEE into keratinized SSE and it is essential to maintain the OEE for normal enamel formation.

研究分野：発生学

キーワード：エナメル質形成 Msx2 エナメル芽細胞 エナメル器 外エナメル上皮 中間層細胞

1. 研究開始当初の背景

将来的な歯の再生を実現する為には正常な歯の発生メカニズムの正確な理解が不可欠である。ヒトやマウス等の哺乳類の歯の発生過程において、口腔上皮由来のエナメル器から内エナメル上皮(エナメル芽細胞)・外エナメル上皮・中間層細胞・星状網細胞が分化し、エナメル質形成を司る。一方頭部神経堤細胞に由来する歯胚間葉から象牙芽細胞・歯髓細胞・セメント芽細胞・歯根膜細胞・骨芽細胞等が分化し、象牙質・セメント質・歯髓・歯根膜・歯槽骨の一部等が形成される。これらに關与する遺伝子群の変異により正常な歯の発生が妨げられ、歯の欠如やエナメル質形成不全、象牙質形成不全等の先天性形態異常が惹起される。従って歯の形成に關与する遺伝子の機能を解明する事はヒトの歯に生じる疾患を理解する上でも重要である。

本研究で着目する Msx2 遺伝子はホメオボックス型の転写因子をコードし、ヒトの MSX2 変異により先天性エナメル質形成不全症を呈する例が報告されている (Suda et al., *Orthod Craniofac Res*, 2006)。Msx2 ノックアウトマウスの歯胚においてはエナメル芽細胞が極性を喪失し、エナメル質形成不全を呈する (Satokata et al., *Nat Genet*, 2000)。しかしながらヒトとマウスにおいて Msx2 変異によりエナメル質形成が阻害される分子機序については未解明であった。そこで Msx2 変異マウスの表現型の詳細な解析を通して、エナメル芽細胞の分化状態の維持機構の一端を明らかにできると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究ではまず野生型マウスの歯の発生過程における Msx2 の正常発現パターンを明らかにする。次に野生型と Msx2 変異マウスの歯胚について組織学的手法や分子生物学的手法を用いて比較検討し、エナメル質形成過程に果たす Msx2 の機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス

生後 3、5、9 日、10、20、25 週齢の対照群 (野生型および Msx2^{+/-}) と変異群 (Msx2^{-/-}) マウスの切歯および臼歯の歯胚を含む顎骨をサンプリングし、以下の実験に用

いた。

(2) 実験手法

ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色、Section in situ hybridization 法、免疫組織化学染色

マウス顎骨を 4%PFA 固定液で固定後脱灰し、通法に従いエタノールとキシレン系列で脱水し、パラフィンに包埋した。回転式マイクロトームを用いて 4 μ m の厚さのパラフィン切片を作製し、組織学的解析に用いた。Ameloblastin、Dentin sialophosphoprotein、Keratin26、Msx1、Msx2、Sonic hedgehog の RNA プローブを作製して Section in situ hybridization 法により遺伝子発現の解析を行った。また抗 Ameloblastin、Amelogenin、Desmoplakin、Enamelin、Heatshock protein 25 (Hsp25)、Keratin10、Keratin14、Keratin73、Loricrin、Notch1、Sox2 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

細胞増殖解析

マウスの腹腔内に BrdU 溶液を投与し、30 分後にサンプリングしてブアン固定液を用いて固定した。パラフィン切片を作製し、抗 BrdU 抗体を用いて細胞増殖解析を行った。

Whole-mount in situ hybridization

マウス下顎切歯を摘出して 4%PFA で固定後、メタノール系列で脱水し、Msx2 の RNA プローブを用いて whole-mount in situ hybridization 法により遺伝子発現を検出した。

マイクロ CT

マウス頭蓋および上顎切歯をマイクロ CT 装置で撮影し、専用ソフトウェアを用いて 3 次元画像を再構築して解析した。

準超薄切片像、透過電顕像

マウス顎骨を固定後脱水し、樹脂に包埋して準超薄切片の作製および透過型電子顕微鏡解析を行った。

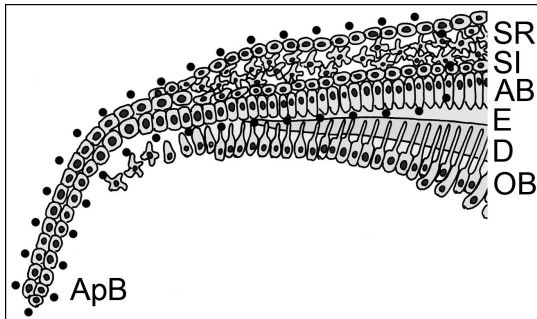
EPMA 元素分析法

マウス顎骨を固定後脱水し、樹脂に包埋して切削器により研磨し、EPMA 分析装置を用いて組織内のカルシウム、マグネシウム、リ

ン元素を検出した。

RT-PCR、マイクロアレイ解析

マウス下顎切歯を摘出して形成端 (apical bud) 付近の上皮を単離後、Trizol 試薬を用いて Total RNA を抽出し、逆転写キットを用いて cDNA を合成した (図 1)。得られた cDNA をテンプレートとして Ameloblastin、Amelogenin、Amelotin、Enamelin、Klk4、Mmp20、ALP、Notch1、Sox2、Keratin25-28、Keratin71-73、 β -actin の各プライマーを用いて PCR により増幅し、2%ゲルに電気泳動してバンドを検出した。また cDNA を用いて外注によりマイクロアレイ解析を行った。

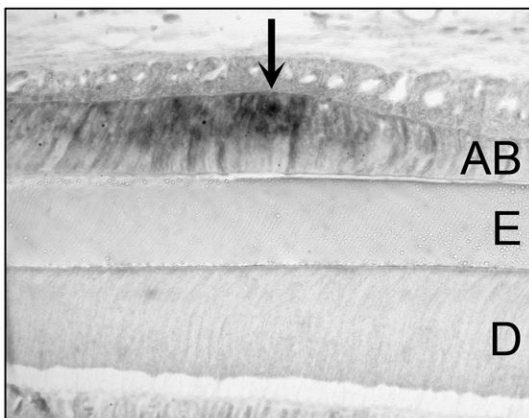


(図 1)

マウスのエナメル器末端付近の模式図。切歯では形成端、臼歯ではサービカルループに相当する。本研究ではおおむね点線で囲んだ領域の組織を単離し、RNA を抽出して実験に用いた。ApB、形成端；AB、エナメル芽細胞；D、象牙質；E、エナメル質；OB、象牙芽細胞；SI、中間層細胞；SR、星状網。

4. 研究成果

(1) 野生型歯胚における Msx2 の正常発現パターン



(図 2)

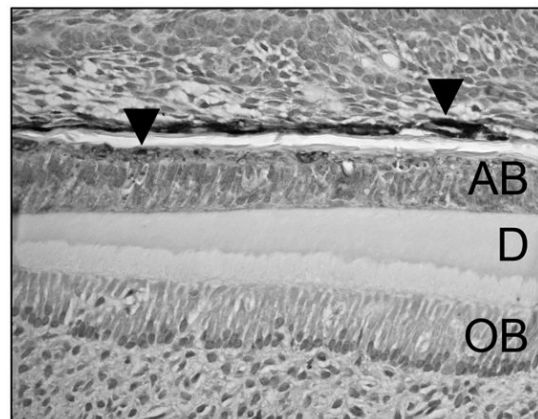
Section および Whole-mount in situ hybridization 法を用いて Msx2 の RNA 発現を解析した所、未分化な内エナメル上皮、移行期のエナメル芽細胞、中間層細胞、外エナメル上皮において発現が観察された。図 2 は生後 9 日目マウス上顎切歯矢状断切片の移行期エナメル芽細胞における Msx2 の発現を示す (矢印、濃染部)。

(2) 変異マウスにおけるエナメル芽細胞および中間層細胞の初期分化

組織学的解析や RT-PCR 解析の結果、変異マウスにおいてエナメル芽細胞の極性化や初期分化マーカー (Ameloblastin 等) の発現は比較的正常に認められた。また中間層細胞マーカー (Notch1 等) の発現も観察された事から、エナメル芽細胞や中間層細胞の初期分化にとって Msx2 は必須の因子ではない事が明らかとなった。

(3) 変異マウスエナメル器内の嚢胞形成

野生型では外エナメル上皮は単層であるが、変異マウスでは外エナメル上皮が角化重層扁平上皮化し、エナメル器内に角化嚢胞が形成された。本来の外エナメル上皮に相当する層が基底層となり、BrdU 解析で細胞増殖の有意な亢進が認められた。基底層から中間層細胞とエナメル芽細胞に向かって有棘層および角質層に相当する細胞が蓄積し、Loricrin や Hsp25 等の角化重層扁平上皮マーカーを異所性に発現した (図 3)。この重層扁平上皮化の進行に伴いまず中間層細胞が分化状態を喪失し、次いでエナメル芽細胞が極性を喪失した。



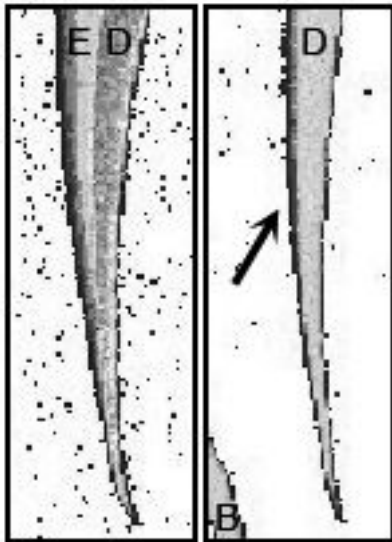
(図 3)

生後 9 日目変異マウス上顎切歯矢状断切片

における、エナメル器内の Hsp25 の異所性発現（矢頭、濃染部）。

(4) 変異マウスにおけるエナメル質形成

EPMA 元素分析により、変異マウス歯胚においてはエナメル質がほとんど形成されていない事が明らかとなった（図 4）。



(図 4)

野生型（左）と変異マウス（右）の生後 20 週齢の上顎切歯形成端付近矢状断のカルシウム元素分析像。

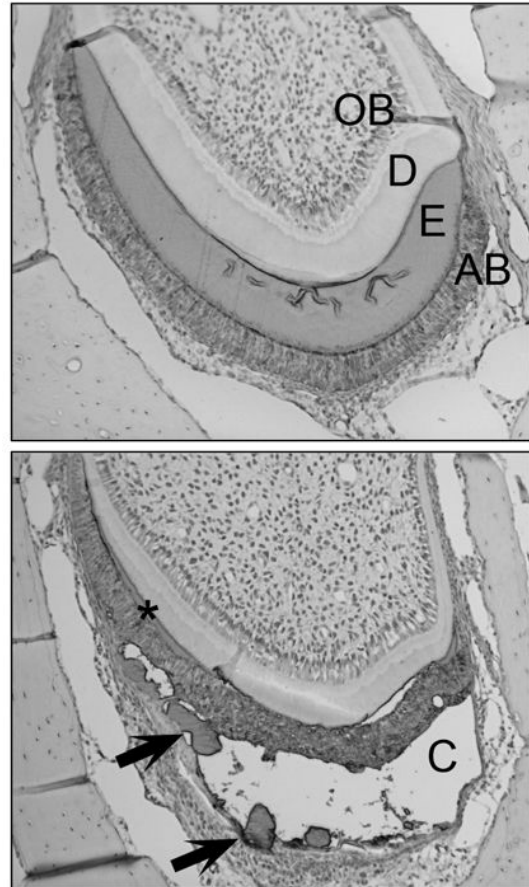
(5) マイクロアレイ解析

野生型と変異マウスのエナメル器内の遺伝子発現の違いについてマイクロアレイ法により解析した所、変異マウスでは毛特異的遺伝子の発現が有意に上昇していた。組織学的解析を試みた所、Keratin26 および Keratin73 の異所性発現が観察された。これらは野生型の歯胚では全く発現が認められなかった。この結果から変異マウスの外エナメル上皮は口腔上皮様の角化重層扁平上皮に転換するだけでなく、口腔には通常見られない毛に関連する遺伝子も異所性に発現する事が明らかとなった。

(6) 嚢胞壁の組織学的解析

変異マウスにおいて極性を喪失したエナメル芽細胞はエナメル器の嚢胞内に散在して Ameloblastin、Amelogenin、Enamelin のようなエナメルタンパクを分泌し、異所性石灰化物を形成した（図 5）。EPMA 解析やマイクロ CT 解析においてもこれらの石灰化物の存在が認められた。この結果はエナメル

芽細胞にとって極性化の有無は生存とは無関係であり、極性を喪失してもエナメルタンパクを分泌する能力を保持し続ける事を意味している。



(図 5)

野生型（上段）と変異マウス（下段）の生後 20 週齢の下顎切歯前頭断切片における Enamelin 免疫染色像。変異マウスエナメル器の嚢胞内にエナメルタンパク陽性の異所性角化物が認められる（矢印）。

(7) まとめ

以上の結果よりエナメル質形成過程においてエナメル芽細胞と中間層細胞の正常な分化状態を維持する為には外エナメル上皮の機能維持が必須であり、Msx2 が通常は外エナメル上皮の角化重層扁平上皮化を抑制する主要な因子である事が明らかとなった。またエナメル芽細胞の極性化はエナメル基質を一方に分泌する為に必要であり、極性化を喪失してもエナメル基質を分泌する能力そのものは保持される事が明らかとなった。本研究の成果によりエナメル器の機能の一端が解明され、今後の更なる歯胚発生研究の基盤となる知見が得られた。

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)

[学会発表](計2件)

中富満城、依田浩子、大島勇人：マウスのエナメル芽細胞の極性維持に関する Msx2 遺伝子の機能. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山、2013.9.20-22.

中富満城、依田浩子、大島勇人：マウス Msx2 遺伝子は外エナメル上皮の角化重層扁平上皮化を抑制する. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、福岡、2014.9.25-27.

6．研究組織

(1)研究代表者

中富 満城 (NAKATOMI, Mitsushiro)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10571771