

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670851

研究課題名(和文) 昆虫の休眠ホルモンを用いた組織保存液の開発

研究課題名(英文) The development of tissue preservation solution using diapause hormon of insects

研究代表者

菊池 和子 (Kikuchi, Kazuko)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：40326690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫が休眠するときに発現する休眠ホルモン、ヤママリンを応用した組織・細胞保存液の開発を目的に研究を行った。エナメル上皮細胞における細胞内ATP濃度、細胞周期、細胞増殖に対するヤママリンの効果を検討したところ、ヤママリンがATP濃度の低下、細胞周期と増殖の停止を引き起こす事がわかった。しかし一部の細胞ではアポトーシスが誘導されており、同じ培養皿の中でも細胞によって結果に大きなばらつきがみられた。このばらつきの原因は、ヤママリンの細胞毒性に対する感受性が細胞によって異なっているためと考えられた。今後はヤママリンを水溶性にする方法や細胞毒性を低減させる改善が必要であると考えられた。

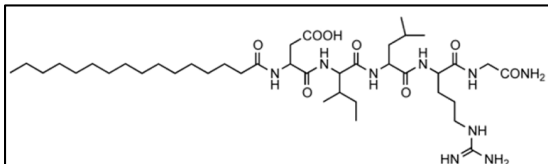
研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the development of novel cell-tissue preservation solution using diapause hormone, Yamamarin, secreted from dormant insects. We evaluated the effect of Yamamarin on the intracellular ATP concentration, cell cycle and cell proliferation in dental enamel epithelial cells. Administration of Yamamarin induced the decrease of intracellular ATP concentration and the arrest of cell cycle and proliferation. However, in some cells apoptosis was induced and large variation was seen in the results. Based on these results, we speculated that the large variation was caused by the differences of sensitivity for cell toxicity of Yamamarin in each cell. It is necessary to reduce the cell toxicity and to render Yamamarin water-soluble in the future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：休眠ホルモン 細胞の保存 組織の保存 ATP 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

小児歯科や障害者歯科では、外傷によって歯を脱落するケースがあり、この脱落した歯の組織のダメージを極力減らすことが再植の成功の鍵を握る。また、近年、歯や歯髄のバンク構想として、抜去した歯を保存して将来の歯や歯周組織、顎骨の再生に応用しようとする試みも行われている。さらに東京理科大の辻らは歯胚を人工的に再構築して歯を再生することに成功している。このような状況で、組織を丸ごと長期保存する技術は、将来必ず必要になると思われる。そこで、我々は岩手大学の鈴木教授が発見し精製した休眠ホルモン、ヤママリン(図1)に注目して、



(図1; 強力ヤママリン)

組織保存液として活用することを発案した。ヤママリンは、アスパラギン酸 - イソロイシン - ロイシン - アルギニン - グリシン (DILRG)を有し、C末端がアミド化されている分子量が570.959である新規ペプチドである。このペプチドは、休眠制御作用やガン細胞の増殖抑制作用を示すことが報告されている(特許公開2010-239963, 2011-51917, 2012-60976)。またこの細胞増殖抑制作用は不可逆的であり、細胞傷害性が極めて低いため、細胞や臓器の保存剤としての有用性が期待できる(鈴木幸一ら:バイオサイエンスとインダストリー, 165(10), 21-25 2007)が、組織保存剤としての有用性は未だ確認されていなかった。

2. 研究の目的

昆虫が休眠するときに発現する休眠ホルモン、ヤママリンにおける組織保存液としての有用性を検討できるような実験系を構築し、新規組織保存剤の開発につなげる。

3. 研究の方法

- ATP結合プローブ(Ateam)を組み込んだエナメル上皮細胞株の作製

細胞内のATP量をリアルタイムで観察する実験系としてATP結合プローブ(Ateam: ATP濃度に応じて色が変化する蛍光プローブ)を発現させるプラスミド(北海道大学 永井博士より供与)をマウス切歯から分離培養したエナメル上皮細胞に導入する。そして恒常的にAteamタンパクが発現する細胞を純化し細胞株を作製する。

- Ateam発現細胞株における細胞内ATP濃度測定

1で作製した細胞株のATP濃度を倒立共焦点顕微鏡によるFRET解析にて経時的に測定する。

- Fucciマウスからエナメル上皮細胞株の作製

蛍光タンパクにて細胞周期をリアルタイムで観察できるFucciマウス(G1期で核が赤, S/G2/M期で緑の蛍光を発する)切歯からエナメル上皮細胞を取り出し、株化をおこなう。

- Fucciエナメル上皮細胞株を用いたヤママリンの細胞周期に与える影響の解析

3で作製したFucciエナメル上皮細胞にヤママリンを加えた際の細胞周期の変化を、倒立共焦点顕微鏡にて経時的に観察する。

- ヤママリンがエナメル上皮細胞の細胞増殖に与える影響の検討

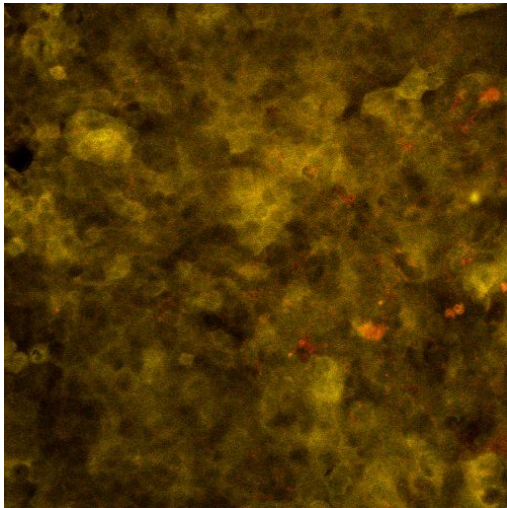
マウスエナメル上皮細胞にヤママリンを加え、細胞増殖をDAPI染色による細胞カウント(Cytell, GE BioScience)にて評価する。

4. 研究成果

岩手大学鈴木教授が精製・開発したヤママリンあるいはスーパーヤママリンを用いて、その効果を確認するための実験系の開発に取

り組んだ。

- マウス切歯エナメル上皮細胞に Ateam プラスミドを導入し、その細胞株を作製することができた。(図2)

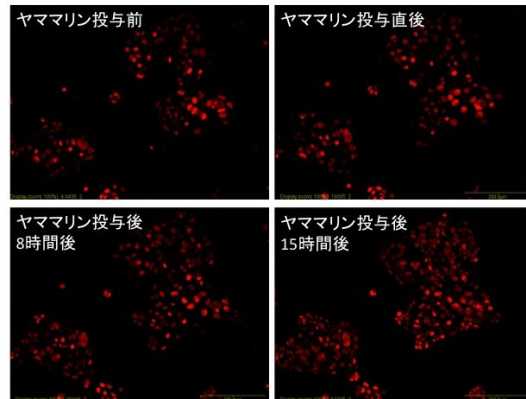


(図2、Ateamを導入したマウスエナメル上皮細胞)

この細胞にスーパーヤママリンを加えた場合、このホルモンの効果は同じ培養皿の中でも細胞の状態によってばらつきを示した。このばらつきの原因は、ヤママリンの細胞毒性に対しての感受性が細胞や細胞の状態によって異なっていると考えられた。

- 細胞周期を観察できる Fucci マウスから分離培養したエナメル上皮細胞株を用いて、このホルモンが細胞の周期に与える影響を検討した。細胞にスーパーヤママリンを加え、赤色タンパクの蛍光強度を経時的に観察したところ、時間とともに赤色タンパクを発現する細胞の数とその蛍光強度が増加していった(図3)。このことはスーパーヤママリンが細胞周期を G1 期で止める働きをもつことを示唆していた。しかし、「すべての細胞の周期が停止する」という予想に反して、同じ種類の培養皿内の細胞でも異なる反応を示した。この結果も細胞の状態によってスーパーヤママリンに対する感受性が異なっ

いたためと思われた。

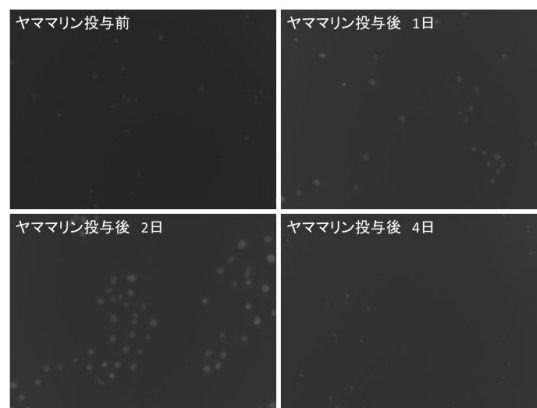


(図3、スーパーヤママリン投与後の Fucci red 蛍光)

- ヤママリンが細胞増殖に与える影響を調べるために、エナメル上皮細胞を 96well プレートに播種したのち、スーパーヤママリンをくわえ、経時的に細胞数をカウントした。スーパーヤママリン投与後、3 日目まで細胞は増殖をしたが、4 日以降多くの細胞で細胞死が誘導された(図4)。このことから、スーパーヤママリンの長期投与には異なる濃度や投与方法の検討が必要であると考えられた。

考察

ヤママリンの問題点は、効果を有するためには高濃度に使用する必要がある



こと、またスーパーヤママリンは低濃度で細胞に影響を与えることが可能であるが、水に対しては難溶解性で DMSO などを用いて溶解しなければならない問題点があり、DMSO の影響

を無視できない点がある。ヤママリンの抗腫瘍増殖効果（代謝活性の低下）はすでにいくつかの報告があるが，腫瘍化していないエナメル上皮細胞株（自立的不死化細胞株）については細胞へのダメージが比較的大きく，スーパーヤママリンを水溶性にする方法や細胞毒性を低減させる改善が今後解決すべき問題であると考える。

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 1 件）

Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects.

Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Kikuchi K, Keller L, Lesot H, Harada H Frontiers in Physiology 5 36 2014

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 安全で効率の良い iPS 細胞由来神経堤細胞を用いた骨再生法の開発 大津圭史，菊池和子，藤原尚樹，原田英光 第 15 回 日本再生医療学会総会，大阪 2016 年 3 月 17 日

2. iPS 細胞由来神経堤細胞をもちいた骨再生の可能性 菊池和子，守口霞，佐賀明子，鈴木史人，熊谷美保，久慈昭慶 第 31 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会，仙台 2014 年 11 月 16 日

〔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：

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

菊池 和子 (KIKUCHI, Kazuko)

岩手医科大学 歯学部 助教

研究者番号：40326690

(2) 研究分担者

藤原 尚樹 (Fujiwara, Naoki)

岩手医科大学 歯学部 准教授

研究者番号：20190100

大津 圭史 (OTSU, Keishi)

岩手医科大学 歯学部 講師

研究者番号：60509066