

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861784

研究課題名(和文)全く新しいエナメル芽細胞の効率的な単離方法の確立と特異的な遺伝子発現の探索

研究課題名(英文)The establishment of a novel isolation method of ameloblast and search of specific gene expression

研究代表者

村上 隆 (Murakami, Takashi)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：00534786

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)：本研究は、これまで困難であったエナメル芽細胞の効率的な単離方法を確立させ、歯の発生過程におけるエナメル芽細胞の遺伝子発現ならびにその分化制御に関する基盤的情報を得ることを目的に、胎生マウスから歯胚を摘出後、エナメル芽細胞を含む細胞群を分離・回収した。各歯胚をメス等を用いて細断後、コラゲナーゼ等を用いて、エナメル芽細胞を含む細胞群を分離・回収した。フローサイトメトリーを実施するにあたり、歯胚から分離・回収した細胞群は、可能な限り単一細胞に分離させておく必要があるため、各試薬を用いて分離・回収した細胞群において、少ないサンプルからより多くのエナメル芽細胞を効率的に取り出すための条件設定を探索した。

研究成果の概要(英文)：It has been impossible to reproduce tooth enamel when it was destroyed by caries. The standard treatment for a cavity is to fill the tooth by using restorative materials. Therefore, it has been expected that the elucidation of the differentiation and maturity of ameloblast to form enamel, and the mechanism to produce the substrate. However, it has been difficult to gather ameloblast from the dental germ in the developmental process. This study investigated a new technique to gather ameloblast effectively from a dental germ.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エナメル芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

エナメル質は、歯を構成する生体内で最も硬い組織であり、人が食生活を営む上で重要な役割を果たす。これまで、エナメル質は一旦蝕蝕等で破壊されると再生することは不可能であり、人工物による修復治療しか行えなかった。そのため、エナメル質を形成するエナメル芽細胞の分化・成熟およびその基質産生メカニズムの解明が望まれてきた。

歯のエナメル質を作るエナメル芽細胞は、歯の萌出後消失するため、胎生期の歯胚を用いて解析する必要がある。しかし、発生期の歯胚は上皮間葉相互作用により異なる由来の細胞が多種混在しており、これまでの技術ではエナメル芽細胞を採取し解析することは困難であった。そのため、エナメル芽細胞の発生分化過程における遺伝子発現情報は他種細胞と比較し著しく乏しく、その分化・成熟機能や動静、ならびにエナメル基質産生メカニズムは未だ解明されていない。

これまでに、凍結組織切片や少量の組織からレーザーマイクロダイゼクションを用いて物理的にエナメル芽細胞を単離する方法や、選択培地で選択培養する方法等が試みられてきたが、発生過程にある新鮮な歯胚から直接大量のエナメル芽細胞を採取する方法は確立されていない。

申請者の研究室ではこれまで、歯の発生の分子メカニズムに関する研究を継続的に行って来た。また申請者は、分化成熟過程の下顎頭軟骨における遺伝子発現を、レーザーマイクロダイゼクションを用いて検討してきた。

一方、20世紀半ば、特定の細胞だけを物理的に分離、回収する技術としてフローサイトメトリーが開発された。この技術は、近年飛躍的に向上し、一般使用されるようになってきた。申請者の研究室でも、これまでに歯髓細胞や歯根膜細胞から表面抗原を用いて幹細胞のソーティング抽出を行い、さまざまな

細胞種に分化誘導させることに成功してきた。

加えて、これまで生細胞は、細胞表面の特定抗原しか蛍光標識することができなかったが、近年 mRNA を直接蛍光標識できる SmartFlare プローブが開発された。そこで今回、このような技術とこれまでの研究成果を併せて、エナメル芽細胞マーカーであるアメロジェニン等の mRNA を直接蛍光ラベルし、新鮮組織から生きたエナメル芽細胞のみを効率的に採取するという着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1) 歯胚からエナメル芽細胞を効率的に大量に単離する方法を確立する。

mRNA を直接標識できる SmartFlare プローブとフローサイトメトリーを利用し、発生過程の歯胚からエナメル芽細胞の効率的な単離方法を新たに確立させる。

(2) エナメル芽細胞特異的に発現する遺伝子ならびにそのオープンクロマチン領域を同定する。

発生過程におけるエナメル芽細胞が特異的に発現する遺伝子を同定する。同定した遺伝子については、その経時的な発現量も明らかにする。さらに、エナメル芽細胞のオープンクロマチン領域を同定し、発生期のエナメル芽細胞の特性や歯の発生段階におけるエピジェネティック制御の分子機構の検討を行う。

動物組織等から目的の細胞だけを直接回収するためには、これまでレーザーマイクロダイゼクション法や組織培養法が試みられてきた。しかし、解析のための十分量を得るには、多くのサンプルや膨大な作業時間が必要であった。加えて、特定の細胞種における特定の分化段階のサンプルのみを回収することはほぼ不可能であった。

本研究の学術的な特色は、エナメル芽細胞の効率的な単離方法が確立されるだけでな

く、未だ解明されていない歯の発生過程におけるエナメル芽細胞の遺伝子発現を明らかにする点にある。

本研究の独創的な点は、今までこのような用途に使用されてこなかったフローサイトメーターおよびセルソーターを利用することにより、新鮮組織から直接ターゲットとなるエナメル芽細胞のみを効率的に単離すると着想した点にある。

本研究成果により、幹細胞や iPS 細胞から分化・誘導したエナメル芽細胞を効率的に成熟・増殖させることが可能となる。その結果、エナメル質を大量に産生させたり、効率的に石灰化させる方法の開発が期待され、エナメル質再生における基盤的研究になると考えられ、学術的に非常に意義が高い。さらに、種々の細胞腫が混在している他臓器である毛髪、腎臓、肝臓および膵臓等の組織からも、特定のステージの特定の細胞のみを回収することが可能となり、歯科領域を超えた幅広い分野において臨床応用されることが期待され、臨床的意義も非常に高い。

### 3. 研究の方法

本研究は、これまで困難であったエナメル芽細胞の効率的な単離方法を確立させ、歯の発生過程におけるエナメル芽細胞の遺伝子発現ならびその分化制御に関する基盤的情報を得ることを目的に、以下の実験を行う。

(1) 胎生マウスから歯胚を摘出後、エナメル芽細胞を含む細胞群を分離・回収する。少ないサンプルからより多くのエナメル芽細胞を取り出すための条件検討を行う。フローサイトメーターおよびセルソーターを用いて、アメロジェニン mRNA の SmartFlare プロープで標識したエナメル芽細胞を単離する。

14 週、16 週および 18 齢雌性 ICR 妊娠マウスを頸椎脱臼させ、腹腔から胎児を摘出する。摘出したマウス胎児は速やかに断頭し、下顎骨を分離する。その後、実体顕微鏡下にて、

35G 注射針等を用いて下顎臼歯歯胚を摘出する。

回収した各歯胚をメス等を用いて細断後、ディスペラーゼやコラゲナーゼ等を用いて、エナメル芽細胞を含む細胞群を分離・回収する（この段階ではエナメル芽細胞は他種の細胞と混在した状態となる）。フローサイトメトリーを実施するにあたり、歯胚から分離・回収した細胞群は、可能な限り単一細胞に分離させておく必要がある。そのため、各試薬を用いて分離・回収した細胞群において、さらに効率的な試薬濃度や反応時間を詳細に検討し、少ないサンプルからより多くのエナメル芽細胞を効率的に取り出すための条件設定を行う。

目的遺伝子の mRNA に結合するプロープを作成するためには、システム上目的遺伝子が恒常的に発現する細胞株が必要である。このため、まずエナメル芽細胞マーカーであるアメロジェニン遺伝子をマウス mRNA ライブラリからクローニングし、哺乳動物用ベクターに組み、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3 にトランスフェクションさせる。その後、選択培地を用いて長期培養し、恒常的にアメロジェニン遺伝子を強制発現する細胞株を作製する。この細胞株を用いて SmartFlare プロープを作製した後、臼歯歯胚から分離した細胞群に反応させ、コンフォーカル顕微鏡を用いて標識の有無を確認する。また、フローサイトメーターとセルソーターによる細胞単離の指標とするため、その結合率も測定する。

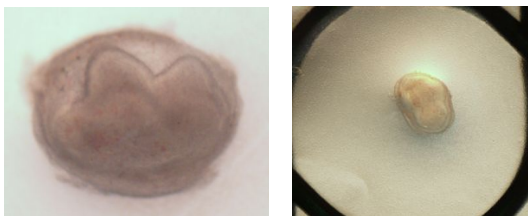
(2) 単離したエナメル芽細胞から total RNA および DNA を回収し、マイクロアレイ法による遺伝子発現解析ならびに Chip シーケンス法によるエピゲノム解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) 胎生マウス歯胚からエナメル芽細胞の単離条件を検索した。

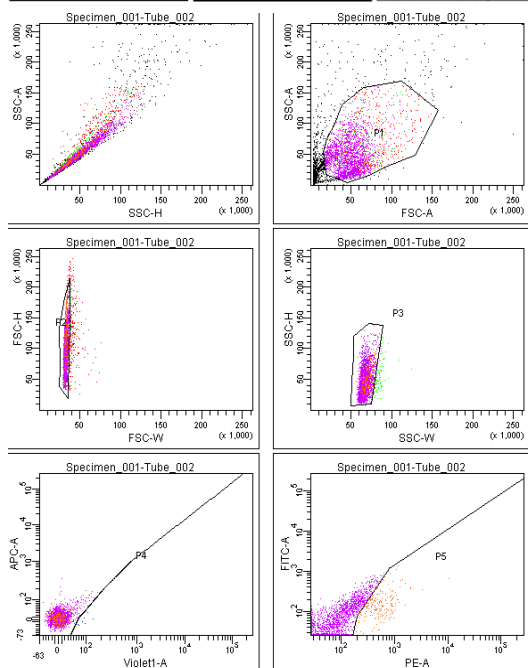
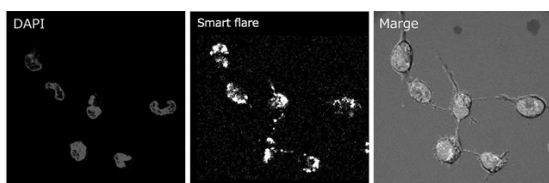
胎生 14 週、16 週および 18 齢 ICR マウス下

顎骨を分離した後、下顎臼歯歯胚のみ抽出した。



メス等を用いて細断後、ディスペラーゼやコラゲナーゼ等を用いて、エナメル芽細胞を含む細胞群を分離・回収した。

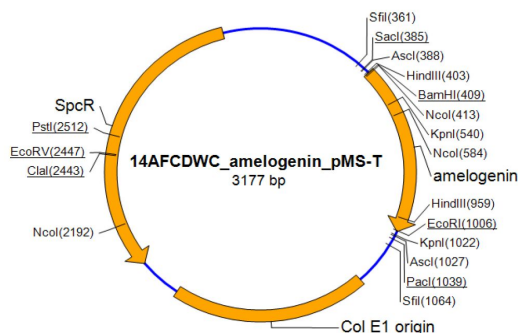
まず、分離・回収したマウスの歯胚細胞に、SmartFlare RNA 検出プローブのコントロールである SmartFlare Uptake が取り込まれることを確認した。



条件として、回収したマウス歯胚は非常に小さいため、フローサイトメトリーを実施するためには、妊娠マウス 2 匹程度必要であることを確認した。

次に、エナメル芽細胞マーカーであるアメロジェニン遺伝子をマウス mRNA ライブラリからクローニングし、SmartFlare プローブの作成し、哺乳動物用ベクターに組んだ。

Plasmid Map:



また、同時にマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3 にトランスフェクションさせるための選択培地を作製した。恒常的にアメロジェニン遺伝子を強制発現する細胞株を作製する必要がある。

(2) 単離したエナメル芽細胞からの total RNA および DNA を回収し、マイクロアレイ法による遺伝子発現解析ならびに Chip シーケンス法によるエピゲノム解析は、実験の進行が遅れているため、今後継続して実施する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 隆 (MURAKAMI TAKASHI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：00534786

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし