

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20579

研究課題名(和文) IGF-1による再生歯胚の形態制御機構に関する研究

研究課題名(英文) Role of IGF-1 in morphogenesis of bioengineered teeth

研究代表者

吉田 倫子 (YOSHIDA, MICHIKO)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80746818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、これまでIGF-1添加による再生歯の大きさの増大と咬頭数の増加を明らかにしたが、再生歯形態におけるIGF-1の作用メカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、IGF-1が再生歯形態に及ぼす影響の基盤となる生物学的メカニズムの解析を行った。歯胚上皮細胞を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、IGF-1添加群において、歯の発生過程において特異的に発現する因子の発現量の増加を認められた。さらに、IGF-1添加群において、歯胚上皮細胞の増殖および分化の亢進、エナメル結節形成の亢進が認められた。以上により、IGF-1が歯の形態形成過程における生物学的メカニズムに関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We reported that the IGF-1 treatment increased the size and cusp number of bioengineered teeth. However, the biological mechanisms of IGF-1 on the bioengineered teeth morphology remain unclear. In this study, we examined the biological mechanisms underlying the effect of IGF-1 on the bioengineered teeth morphology. Microarray analysis was performed using dental epithelial cells derived from tooth germs. The IGF-1 treated dental epithelial cells expressed high level of various factors which are expressed during tooth development. Moreover, the proliferation and differentiation of the IGF-1 treated dental epithelial cells were significantly upregulated. The number of the enamel knot increased in the IGF-1 treated bioengineered teeth. These data suggest that IGF-1 is involved in the biological mechanisms during tooth development.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生歯胚 IGF-1 エナメル結節

## 1. 研究開始当初の背景

近年、失われた歯に対する次世代の歯科治療として、再生歯の研究が盛んに行われてきており、患者自身の細胞を三次元的に再構築し、生理的に機能する歯を再生させる歯科再生医療の実現化が期待されている。多数歯にわたる先天性欠如の起こる頻度は約 7~8% であり、これまで、矯正的歯の移動による欠損部の空隙閉鎖や人工的な補綴物での処置が行われてきた。歯の先天性欠如に対する治療の重要性が注目され、2012 年に 6 歯以上の非症候性部分無歯症の矯正歯科治療は保険適用となった。将来的に、「歯の再生」の実用化が可能になった場合、治療の選択肢は増え、国民の歯科医療において益をもたらすことは計り知れない。

申請者の所属するグループは、世界に先駆けて、器官原基法を応用してマウス歯胚を人為的に作製し、成体マウス口腔内で再生歯が発生・萌出することを証明し、歯の再生の実用化に向けた基礎研究を推進してきた (Ikeda et al, PNAS, 2009)。さらに、申請者の所属するグループは、insulin like growth factor I (IGF-I) 長期投与によりコントロールされている妖精症患者において歯冠幅径の増大を認め、正常な咬頭に加えて複数の咬頭様構造物がみられることを報告した (Fukunaga et al, Angle Orthod, 2008)。この知見から、歯の発生を調節する因子のうち、IGF-I が歯の“大きさ”と“かたち”を制御する働きを担っていると推論し、器官原基法を用いて再生歯の大きさの制御に IGF-I が大きな役割を果たしていることを示した。

このように申請者の所属するグループは、歯の大きさを規定する因子を同定し研究を進めてきたが、天然歯と同等の形態的特徴を示す歯を再生するためには、再生歯形態における IGF-I の作用メカニズムをさらに詳しく解析することが必要不可欠である。歯の形態の決定には咬頭が大きく影響し、咬頭数、大

きさ、高さ、形、咬頭間距離などの要素により、最終的な歯の形態が規定される。この咬頭の発生においてエナメル結節の形成が必須であることが明らかにされている (Tucker et al, J Dent Res, 1999; Thesleff et al, Mech Dev, 2000)。エナメル結節には、帽状期に観察される歯胚上皮中央付近の細部塊である一次エナメル結節と、臼歯の鐘状期にのみ観察される二次エナメル結節がある。このエナメル結節形成の制御過程において、上皮・間葉組織間での様々なシグナル伝達が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。これまでの研究から、エナメル結節における上皮・間葉相互作用には Msx2-BMP4-p21 (Jernvall et al, Development, 1998)、Wnt10b-Lef1-FGF4 (Kratochwil et al, Genes Dev, 2002) などのシグナル伝達経路が存在することが報告されている。しかしながら、エナメル結節の複雑かつ緻密な制御を考えると、これまでに同定されてきた分子だけではそのメカニズムを十分に説明することは困難であり、未知のシグナル伝達経路が存在する可能性が強く示唆される。

したがって、申請者は IGF-I を応用した再生歯の形態制御方法の確立を目指し、歯の発生過程において IGF-I が歯の形態制御に及ぼす影響を遺伝子発現レベルで網羅的に解析するために、細胞現象に関わる遺伝子群の候補を検討するうえで有効な手法であるマイクロアレイによるデータマイニングを応用することを着想した。さらに、再生歯形態における IGF-I の分子作用メカニズムを解明するために、歯胚上皮細胞およびエナメル結節における IGF-I の影響を解析することとした。以上により、歯の形態形成過程における IGF-I の下流因子の探索およびその機能解析、IGF-I の分子作用メカニズムを解析することにより、歯の形態制御における IGF-I シグナルネットワークが明らかになると予測される。

## 2. 研究の目的

再生医療は近年様々な領域で研究が推進されており、歯科分野においても、いかに生理的な機能を持つ歯の再構築を行えるかが期待されている。申請者らは、再生歯の生理的機能を特定する因子を探索したところ、IGF-1 添加により再生歯の大きさの増大と咬頭数の増加を認めた。IGF-1 が、再生歯の大きさに関与していることを明らかにしたが、再生歯形態における IGF-1 の作用メカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、IGF-1 が再生歯形態に及ぼす影響の基盤となる生物学的メカニズムの解析を進める。

まず、歯の発生過程において IGF-1 が歯の形態制御に及ぼす影響を遺伝子発現レベルで網羅的に解析するために、エナメル結節形成において必要不可欠である歯胚上皮細胞を用いてマイクロアレイを行う。次に、歯胚上皮細胞の増殖および分化に対する IGF-1 の影響と、歯の咬頭形成に必須であるエナメル結節形成における IGF-1 の影響を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯胚の摘出および器官培養

野生型マウス胎仔から胎生 14.5 日齢の下顎臼歯歯胚を摘出し、IGF-1 添加、非添加にて器官培養 (Ikeda et al, PNAS, 2009) を行った。

### (2) マイクロアレイ解析

器官培養を 7 日間行った、IGF-1 添加、非添加の歯胚を各々上皮細胞と間葉細胞に分離した。得られた上皮細胞を用いてマイクロアレイを行い、歯の発生において上皮に発現する因子に着目して解析を行った。さらに、解析した因子の RNA を試料として用い、リアルタイム PCR により定量的に解析し、IGF-1 添加群、非添加群における発現量の比較を行った。

### (3) 歯胚上皮細胞の増殖能の解析

胎齢 14.5 日マウスの下顎臼歯歯胚から上皮細胞を単離し、フィブロネクチンおよび型コラーゲンコートしたガラスボトムディッシュ上で培養した。翌日、IGF-1 を培地に添加し、培養 2 日目に BrdU Labeling Reagent を添加培養後、70% ETOH を用いて 4 下で 15 分固定した。固定後、Triton-X100 含有 PBS を用いて室温で処理した。さらに、Denaturing Solution (BrdU Staining Kit) を用いて室温で処理した。ブロッキング処理後、Alexa Fluor 488-conjugate BrdU antibody を用いて室温で一晩反応させた。核の標識には DAPI を用いた。サンプルは、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した。

### (4) 歯胚上皮細胞の分化能の解析

胎齢 14.5 日マウスの下顎臼歯歯胚から上皮細胞を単離し、フィブロネクチンおよび型コラーゲンコートしたガラスボトムディッシュ上で培養した。翌日、IGF-1 を培地に添加し、培養 4 日目に 4% PFA を用いて室温で 15 分間固定後、Triton-X100 含有 PBS を用いて処理を行った。bovine serum albumin 含有 PBS を用いて室温でブロッキングした後、anti-Ameloblastin 抗体を 4 で一晩反応させた。さらに goat anti-rabbit IgG Alexa 488 を室温で 1 時間反応させた。核の標識には DAPI を用いた。シグナルを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出した。さらに、歯胚上皮細胞における ameloblastin の発現をリアルタイム PCR にて測定した。

### (5) ホールマウント *In Situ* ハイブリダイゼーション

器官培養 1 日目から 5 日目までの再生歯胚を、4% PFA を用いて 4 で一晩浸漬固定後、過酸化水素を用いて常温で処理し、proteinase K を用いて処理した。さらに、後固定 (post fixation) 及びプレハイブリダイゼーションを行い、ジゴキシゲニン (DIG) 標識された RNA プローブを用いて一晩ハイブリダイゼーションを行った。ブロッキングを行

い、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体を 4 で一晩反応させた。抗体を洗浄後、nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4chloro-3-indolyl phosphate を基質としてアルカリフォスファターゼ活性を検出した。

#### 4. 研究成果

(1) IGF-1 が歯胚上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について

マイクロアレイ解析の結果より、IGF-1 添加群において、歯の発生過程における歯胚上皮細胞に特異的に発現する因子の発現量の増加が認められた。

(2) IGF-1 が歯胚上皮細胞の増殖に及ぼす影響について

IGF-1 による再生歯のサイズ増大のメカニズムを解析するために、再生歯胚を作製するための細胞ソースである歯胚上皮細胞の増殖に対する IGF-1 の影響を解析した。歯胚上皮細胞において、対照群と比較して IGF-1 添加群では、総細胞数および BrdU 陽性細胞率の有意な増加が認められた。したがって、再生歯胚作製のために用いる胎齢マウス歯胚から単離した上皮細胞の増殖は、IGF-1 により促されることが示唆された。

(3) IGF-1 が歯胚上皮細胞の分化に及ぼす影響について

胎齢マウス歯胚上皮細胞の分化に対する IGF-1 の影響を解析した。培養 4 日目において、歯胚上皮細胞は多角形形状の細胞形態を示したが、IGF-1 の添加による明らかな細胞形態の変化は認められなかった。エナメル芽細胞により分泌されるエナメル基質である ameloblastin の発現をリアルタイム PCR および免疫組織化学における定量的解析を行った結果、対照群と比較し、IGF-1 添加群では ameloblastin 発現の有意な増加が認められた。したがって、IGF-1 は歯胚上皮細胞の分化を亢進することが示された。

(4) IGF-1 が再構成歯胚のエナメル結節形成に及ぼす影響について

増殖活性が低下した歯性上皮細胞の集団からなるエナメル結節の形成は、咬頭のパターンニングにおいて必須の生物学的プロセスである。エナメル結節形成における IGF-1 の影響を解析するために、再生歯胚の発達過程におけるエナメル結節マーカーである FGF4 の発現を、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した。培養 1 日目の再生歯胚では、FGF4 の発現は検出されなかった。培養 2 日目の再生歯胚において、両群とも FGF4 の発現が検出され、培養 3 および 4 日目の再生歯胚では、歯冠幅径の増大に応じて FGF4 の発現領域が拡大した。培養 5 日目の再生歯胚では、FGF4 発現スポットが検出され、IGF-1 添加群では、対照群に比べて発現スポット数の増加を示した。以上により、再生歯胚の発達過程において、IGF-1 はエナメル結節の数を増加させることが示唆された。

#### 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)

[学会発表](計 3 件)

竹下信郎、関大輔、清流正弘、木村晴地、高野郁子、大柳俊仁、吉田倫子、長谷川正和、山本照子、機械的刺激が促す骨形成過程における前駆骨芽細胞凝集への CCN2/CTGF の影響、第 8 回日本 CCN ファミリー研究会、2016 年 8 月 27 日、岡山大学鹿田キャンパス(医学部基礎研究棟 1 階大学院セミナー室) 岡山

大柳俊仁、竹下信郎、関大輔、原真美子、池田悦子、高野郁子、清流正弘、吉田倫子、山本照子、IGF-1 による再生歯の形態制御とそのメカニズム解析、第 34 回日本骨代謝学術集会、2016 年 7 月 20-23 日、大阪国

際会議場、大阪

大柳俊仁、千田透子、竹下信郎、関大輔、  
高野郁子、吉田倫子、清流正弘、山本照子、  
IGF-1 を添加した再生歯胚におけるサイズ  
増大のメカニズムの解析、第 74 回日本矯  
正歯科学会大会、2015 年 11 月 18-20 日、  
福岡国際会議場、福岡

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 倫子 (YOSHIDA MICHIKO)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80746818