

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390485  
 研究課題名（和文） メダカ咽頭歯器官培養系を用いた歯の再生実験モデルの確立と幹細胞の探索  
 研究課題名（英文） Establishment of organ culture system for tooth regeneration using pharyngeal teeth of medaka and its use for the exploration of dental stem cells

研究代表者  
 高野 吉郎（TAKANO YOSHIRO）  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
 研究者番号：90126425

## 研究成果の概要：

本研究は常時 脱落と交換を繰り返すメダカ咽頭歯を用いた歯の再生実験モデルの確立を目的に計画されたものであり、咽頭歯骨部の構造基盤と歯の発生・発達・交換の全容を初めて光顕、電顕レベルで明らかにした。更に同部の器官培養系を立ち上げて歯胚とその関連細胞の分化・機能維持が可能な培養条件を決定した。本メダカ咽頭歯骨部器官培養系は歯の発生・発達に伴う機能分子の消長と *vivo* での確認が困難な咽頭歯脱落・交換のリアルタイム観察が可能であり、歯の再生研究への活用が期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2007年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：メダカ、咽頭歯、器官培養、歯の再生、実験モデル

## 1. 研究開始当初の背景

歯の再生は歯科医療の究極の到達目標の一つといえる。近年の幹細胞研究の進展によって、生体では様々な組織に「組織幹細胞」が存在することが知られており、事実、歯の発生の場においても、生涯伸び続けるマウス切歯ではエナメル上皮中に幹細胞 niche が存在することが示され、わずかずつではあるが、歯の再生医療が現実味を帯びてきている。

小型硬骨魚メダカは孵化前から歯の形成が始まり、孵化直後には咽頭部に複数の歯（咽頭歯）が萌出している。咽頭歯は個体の成長とともにその数を増し、成魚では体長がわずか3センチ程度にもかかわらず、咽頭骨上には上下顎合わせて 1000 本にも及ぶ咽頭歯が配列している。魚類一般がそうであるように、メダカは多生歯性であり、咽頭骨上では夥しい数の咽頭歯が常に脱落と新生を繰

り返している。メダカ咽頭歯の圧倒的な数の多さと、この多数の歯が生涯脱落、交換、新生を繰り返すという事実は、この小型魚が歯の幹細胞の同定と歯の交換サイクルを制御するメカニズムを解明するための実験モデルとして、非常に優れた特性を有していることを意味している。

本研究の開始時点では、メダカ咽頭歯部を歯の再生研究のモデル実験系として用いた例は皆無であり、現時点に於いても国内外を通じて本研究が初の試みである。

## 2. 研究の目的

メダカ咽頭歯を用いた新規の歯の再生実験系の確立を目指して以下の各項目について検討する。

(1) メダカ咽頭歯とその支持骨の発生、発達、脱落・交換の経過の形態学的解析

(2) メダカ咽頭歯とその支持骨の発生、発達、脱落・交換の過程で発現する機能分子の同定と局在の解明

(3) メダカ咽頭歯骨部の器官培養法の開発と器官培養

(4) 器官培養系のタイムラプス観察によるメダカ咽頭歯の脱落・交換の実際の観察

(6) 歯の形成異常をきたすメダカ突然変異体の解析

(5) 幹細胞マーカーを用いた *in vivo*, *in vitro* での幹細胞 (ニッチ) の探索

## 3. 研究の方法

メダカ咽頭歯骨部の空間配置の詳細を明らかにし正確に把握することは本研究の基盤を成す重要事項である。軟 X 線、 $\mu$ CT 画像からの咽頭歯骨部の立体復構および走査型電顕観察を行い、歯の配列とその支持骨の三次元立体構築を明らかにする。その上で咽頭歯の発生、発達と脱落・交換の過程を光顕、電顕レベルで明らかにし、酵素組織化学と免疫組織化学、*in situ hybridization* を併用して、歯胚の分化レベルと機能分子の発現および局在を明らかにする。

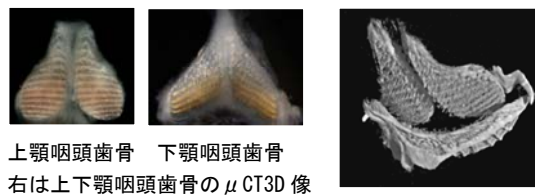
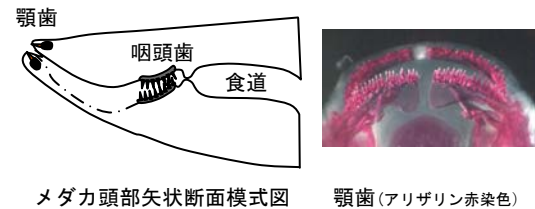
咽頭歯骨部の器官培養系の確立は本研究の根幹を成すものであり、培養に供する咽頭歯骨部の試料調整に加え、長期培養可能な培地とガス雰囲気の設定、培養温度の調整など全般を試行して最適条件を絞り込む。メダカ咽頭部は孵化時点で既に歯が萌出しているため、通常の摘出歯胚の培養に比べ、全処置としての殺菌処理の検討も重要となる。

器官培養の経過は、可能な範囲でタイムラプス顕微鏡によるリアルタイム観察を試みる。培養試料は微細構造、細胞増殖活性、機能マーカーの発現を *in vivo* と比較評価する。

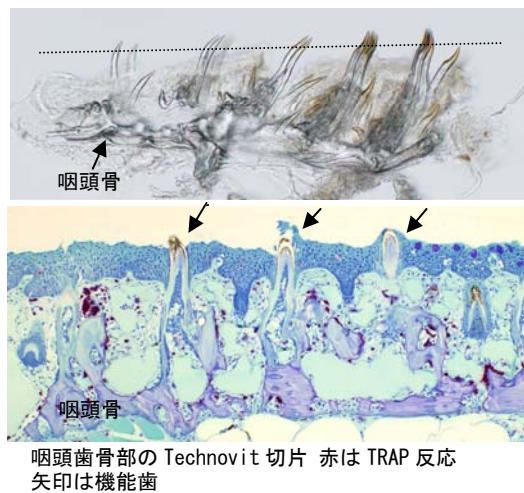
## 4. 研究成果

### (1) 顎歯と咽頭歯

メダカは顎骨 (歯骨) と咽頭骨上に顎歯と咽頭歯を有し、成魚では 1 個体あたり顎歯は 150-200 本、咽頭歯は 800-1000 本にも達する。上下顎ともに左右一対の咽頭骨上には、体軸のほぼ直角方向に、全長  $100 \mu\text{m}$  程の小型歯が畝状に整然と配列している (下図参照)。



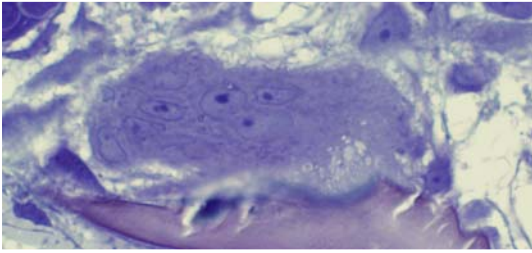
上顎歯は歯足骨を介して咽頭骨と線維性結合を、下顎歯は骨性結合をしており、エナメルイドで覆われた歯冠先端部をわずかに口腔内へ露出させている。下図は下顎咽頭歯骨部の矢状方向の厚切り切片である。幾条かの機能歯群と、その深部に形成途上の歯が認められる。点線は口腔粘膜上皮の位置を示す。



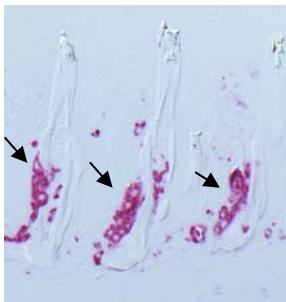
矢状断組織切片を観察すると、歯足骨を介して咽頭骨上に結合している機能歯群と、その間の粘膜上皮から深部へ伸び出す様々な発達段階の歯胚が見られる。歯足骨と歯根表面には強い酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 活性陽性細胞が局在し、同所で活発な骨吸収と歯根の吸収が進行していること、すなわち活発な歯の脱落と交換が進行していることを示している。

(2) 咽頭歯骨にはメダカ骨格系で唯一多核で波状縁を有する破骨細胞が存在する

メダカでは椎骨の一部を除き、全身の骨格に TRAP 陽性細胞は殆ど認められず、椎骨の陽性細胞も単核扁平で波状縁を欠いている。一方で TRAP 陽性細胞が多数集積している咽頭歯骨部には単核の TRAP 陽性細胞も多く認められるが、多核で発達した波状縁を有する大型の破骨細胞も高頻度で観察される。咽頭歯骨部では歯の新生と発達に呼応した骨形成も盛んであり、同部が旺盛な骨の吸収と添加による活発な骨代謝回転の場であることを示している。



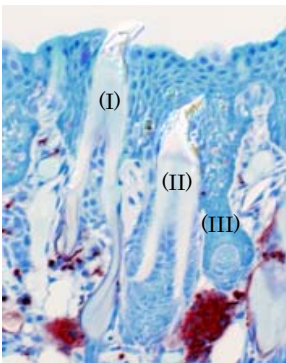
咽頭歯骨部に見られた多核で波状縁を有する破骨細胞



明確な局在性を示す TRAP 陽性の多核細胞 (矢印)。

咽頭歯骨部の破骨細胞は主に歯と歯足骨の吻側に位置することから、歯とその支持骨の吸収は前方 (図左方) から進行する。

(3) メダカ咽頭歯部では次世代、次々世代歯胚の形成が連動して進行する



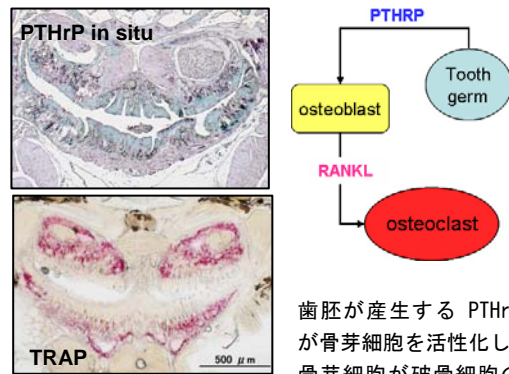
咽頭歯部の矢状断切片を注意深く観察すると、機能歯 (I) の後方に発達した歯胚 (II) と、更にもその後方に連なる初期歯胚 (III) を認めることができる。このような場合、機能歯の歯足骨は既に吸収が進んでいて、脱落間近である場合が多い (矢印)。まだ機能歯の吸収が進行していない状況で次々世代の歯胚を見ることはなく、歯胚の形成誘導が歯の脱落と呼応して進行している様子が伺われる。上下顎合わせて 1000 本にも及ぶ個々の機能歯で代生歯の形成が常時進行している事実は、同部に歯の幹細胞が豊富に存在する可能性を強く示唆しており、メダカ咽頭歯部を歯の再生実験系へ応用する意義は大きい。

まだ機能歯の吸収が進行していない状況で次々世代の歯胚を見ることはなく、歯胚の形成誘導が歯の脱落と呼応して進行している様子が伺われる。上下顎合わせて 1000 本にも及ぶ個々の機能歯で代生歯の形成が常時進行している事実は、同部に歯の幹細胞が豊富に存在する可能性を強く示唆しており、メダカ咽頭歯部を歯の再生実験系へ応用する意義は大きい。

(4) 咽頭歯骨部でのみ破骨細胞の分化と高回転型骨改造が進行する理由は何か

メダカは顎骨と咽頭歯骨部以外では、椎骨の神経弓と血管弓の内面に単核の破骨細胞が存在するのみであり、そこでの骨吸収活性は低い。

我々のこれまでの研究により、PTHrP KO マウスでは破骨細胞の機能低下が生じ、骨梁による歯胚の圧迫障害と、歯の萌出路の形成不全による歯の萌出不全が起きることが明らかにされている。そこで今回、メダカ咽頭歯骨部の前頭断切片上で PTHrP *in situ* hybridization を試みたところ、咽頭歯骨部に PTHrP のシグナル発現が確認された。咽頭歯骨部では、歯胚が産生する PTHrP が局所の骨芽細胞を活性化し、間接的に咽頭歯骨部の破骨細胞の活性化を促進するものと考えられた。



咽頭歯骨部前頭断切片

歯胚が産生する PTHrP が骨芽細胞を活性化し、骨芽細胞が破骨細胞の分化と活性化を促す

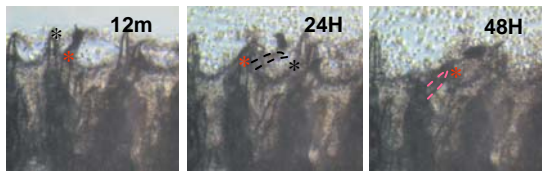
(5) 咽頭歯骨部の器官培養系

歯胚が発達する咽頭歯骨部は粘膜固有層が疎であり、特に歯胚周囲はリンパ洞が発達しているため物質の拡散性が高く、器官培養に適している。しかし咽頭歯骨部の器官培養試料は口腔への露出部を含むため、前処理として入念な消毒殺菌処置が必要である。あらかじめグリーン F ゴールド添加水にて 2~4 日間絶食飼育したメダカから咽頭歯骨部を摘出し、ヒポクロ・PBS とファンギゾン・PBS で処理してから培養を開始した。一部は実体鏡下で機能歯 5 本分程の厚さにスライスしてからヒポクロ・PBS, とファンギゾン・PBS で処理した。培養液はアスコルビン酸と抗生物質を含む 10%FCS 加 L15 とし、26°C 空気雰囲気下で 2~9 日間培養して高成績が得られた。一部試料は培養下でセルウオッチャー® によるタイムラプスムービーを撮影し、器官培養下における咽頭歯の脱落・交換の様相を観察した。

タイムラプス観察により培養 24~48 時間で複数の機能歯が倒壊し、粘膜固有層内へ沈下する様相が確認された。組織像のデータと併せ、本培養結果はメダカ咽頭歯が交換に際して口腔内へ脱落するのではなく、粘膜



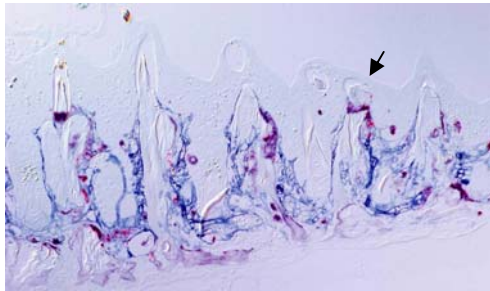
固有層へ沈埋し破骨細胞によって吸収されることが明らかとなった。



咽頭歯骨部スライス培養のタイムラプス像  
星印の機能歯が倒壊、沈埋する様子を示す

培養下における機能歯の新生はまだ確認されていないが、培養試料では vivo の咽頭歯骨部に特徴的な活発な骨の吸収と形成活動が維持されており、培養下での歯の交換の進行が期待されることから、メダカ咽頭歯骨部器官培養系の有用性が示された。

今後は本実験系に基づく培養系の改良を進め、培養下での次世代歯胚の新生と歯の幹細胞の同定、分化誘導因子の特定を目指す。



48 時間器官培養したメダカ上顎咽頭歯骨部  
矢印は倒壊した機能歯を示す  
赤：TRAP 活性、青：ALPase 活性

## 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20件)

- ① Higuchi K, Peerapong S, Terashima T, Nakayama H, Notani T, Iseki H, Baba O and Takano Y: Development and Innervation of Subcutaneously Transplanted Molar Tooth Germs in the Rat. *Eur J Oral Sci* 116: 324-333, 200. 査読あり
- ② Yi Li, Hiroto Nakayama, Takuya Notani, Masud Ahmad, Makoto J. Tabata and Yoshiro Takano: Phosphatase actions at the site of appositional mineralization in bisphosphonate-affected bones of the rat. *J Medical and Dental Sciences*, 55 (3,4): 255-265, 2008. 査読あり
- ③ Shunichi Shibata, Otto Baba, Tsuyoshi Oda, Tamaki Yokohama-Tamaki, Chunlin Qin, William T. Butler, Yasunori Sakakura and Yoshiro Takano: An immunohistochemical and ultrastructural study of the pericellular matrix of uneroded hypertrophic chondrocytes in the mandibular condyle of aged c-src-deficient mice. *Arch Oral Biol*, 53, (3): 220-230.2008. 査読あり
- ④ Ken-ichi Katsube, Naruhito Matsuda, Kazuo Kishi, Yoshiro Takano, Hachiro Iseki, Yuko Katsuki, Akira Yamaguchi, Hideo Nakajima, Shuji Mikami, Makio Mukai, Tatsuo Nakajima: E-cadherin expression in the subepithelial nevus cells of the giant congenital nevocellular nevi (GCNN) correlates with their migration ability in vitro. *J Dermatol Sci* 2008. 査読あり
- ⑤ 1. Nemoto Y, Higuchi K, Baba O, Kudo A, Takano Y: Multinucleated osteoclasts in medaka as evidence of active bone remodeling. *Bone* 40: 399-408, 2007. 査読あり
- ⑥ Miyata A, Baba O, Oda T, Ishikawa I, Takano Y: Diverse effects of C-src deficiency on molar tooth development and eruption in mice. *Arch Histol Cytol* 70: 63-78, 2007. 査読あり
- ⑦ Tseng Y-C, Huang C-J, Chang J, Teng W-Y, Baba O, Fann M-J, Hwang P-P: Glycogen Phosphorylase in Glycogen-Rich Cells Is Involved in Energy Supply for Ion Regulation in Fish Gill Epithelia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R482-491, 2007. 査読あり
- ⑧ Chang J C-H, Wu S-M, Tseng Y-C, Lee Y-C, Baba O, Hwang P-P: Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. *J Exp Biol* 210: 3494-3504, 2007. 査読あり
- ⑨ Inohaya K, Takano Y, Kudo A: The teleost intervertebral region acts as a growth center of the centrum: in vivo visualization of osteoblasts and their progenitors in transgenic fish. *Dev Dyn* 236: 3031-3046, 2007. 査読あり

- ⑩ Suzuki N, Kitamura, K, Nemoto T, Shimizu N, Wada S, Kondo T, Tabata M J, Sodeyama F, Ijiri K, Hattori A: Effect of vibration on osteoblastic and osteoclastic activities: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. *Adv Space Res* 40: 1711-1721, 2007. 査読あり
- ⑪ 田畑 純, 鈴木信雄, 服部淳彦: 魚鱗: 硬組織研究と再生研究のフロンティア細胞 39(2): 55-57, 2007. 査読なし
- ⑫ Takano Y, Nakano Y, Katogi R, Nemoto Y, Kudo A: Remodeling of Acellular Bone in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) and its Possible Contribution to Mineral Regulation of the Body. *Proceedings of 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, 13-15, 2006. 査読あり
- ⑬ Baba O, Qin C, Brunn JC, Terashima T, Bonewald L, Butler WT: Immunolocalization of dentin matrix protein 1 (DMP1) fragments in rat molar. *Proceedings of 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, 143-146, 2006. 査読あり
- ⑭ Qin C, Baba O, Brunn JC, McKee MD, Bonewald L, Butler WT: Unique Similarities between Dentin Matrix Protein 1 and Dentin Sialophosphoprotein. *Proceedings of 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, 174-177, 2006. 査読あり
- ⑮ Takano Y, Nakano Y, Yamamoto-Shuda Y, Baba O, Terashima T: Proteolysis on maturing enamel surface as shown by gel coating methods. *Eur J Oral Sci*, 114 (Suppl 1), 52-58, 2006. 査読あり
- ⑯ Baba O, Miyata A, Abe T, Shibata S, Nakano Y, Terashima T, Oda T, Kudo A, Takano Y: Formation of acellular cementum-like layers with and without extrinsic fiber insertion along inert bone surfaces of aging *c-Src* gene knockout mice. *Eur J Oral Sci* 114: 524-534, 2006. 査読あり
- ⑰ 工藤明, 石岡憲昭, 内田智子, 大森克徳, 河野靖, 高野吉郎, 永松愛子, 夏井坂誠, 西川和香, 藤本信義, 益川充代, 村上敬司: 宇宙におけるメダカ骨代謝. *Space Utiliz Res*, 22: 241-243, 2006. 査読あり
- ⑱ Jayawardena CK, Takano Y: A Nerve-epithelium Interrelation in the Periodontal Ligament of Guinea pig Teeth. *Arch Oral Biol*, 51: 587-595, 2006. 査読あり
- ⑲ Shibata S, Oda T, Abe T, Yamashita Y, Takano Y: Structural features of incremental line-oike striations in mandibular condylar cartilage of *c-src*-deficient mice. *Arch Oral Biol*, 51: 951-959, 2006. 査読あり
- ⑳ Zhang J, Kawashima N, Suda H, Nakano Y, Takano Y, Azuma M: The existence of CD11c<sup>+</sup> sentinel and F4/80<sup>+</sup> interstitial dendritic cells in dental pulp and their dynamics and functional properties. *International Immunol*, 18: 1375-1384, 2006. 査読あり
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 高野吉郎, 東京医科歯科大学大学院 硬組織構造生物学分野: 小型硬骨魚メダカ無細胞骨格系における骨形成と骨吸収, 第 114 回日本解剖学会 シンポジウム, 岡山, 2009 年3月28日
- ② A.D.S. ATUKORALA, Kazunori HIGUCHI, Masayuki YOSHIMI, Makoto J TABATA, Otto BABA and Yoshiro TAKANO: Teeth in Edar deficient medaka fish: an animal model of anhidrotic ectodermal dysplasia, 114<sup>th</sup> Japanese Association of Anatomists, Okayama, Mar 28, 2009.
- ③ 田畑 純, 野谷拓也, 井関八郎, 中山博登, 馬場麻人, 高野吉郎: エナメル上皮細胞と歯髓細胞を用いた三次元・重層培養にける組織再構築と細胞相互誘導, 第 114 回日本解剖学会 シンポジウム, 岡山, 2009 年3月30 日
- ④ Yoshiro Takano: Cement lines and bone quality - A lesson from studies of long-lasting cement lines in osteopetrotic bones of aging *c-src* deficient mice, Invited lecture, Material Research Society Spring

Meeting 2009, April 14, 2009, San Francisco, CA.

- ⑤ Tamaki Hitoshi; Nakayama Hiroto; Takano Yoshiro: Histological evaluation of osteoconductivity and fate of anorganic bovine bone fragments (Bio-Oss®) applied for sinus augmentation preceding implant, Academy of Osseointegration Annual Meeting, February 26- 28, 2009, San Diego, CA. .
- ⑥ Takano Y: Cell Dynamics in Calcium Regulating Epithelium of the Enamel Organ during Tooth Enamel Formation : The 7<sup>th</sup> Federation Meeting of Korean Basic Dental Scientists, 2008, Dec 2-Dec 3, 2008, Seoul, Korea
- ⑦ 高野吉郎: 石灰化機構から象牙芽細胞と骨芽細胞の異同を探る、日本解剖学会シンポジウム:象牙芽細胞と骨芽細胞の違いを考える、第 113 回日本解剖学会学術大会、平成 20 年 3 月 27 日～29 日、大分大学
- ⑧ Inohaya K, Takano Y, Kudo A: Analysis of the Dharma-medaka mutant, which shows a defect in formation and/or maintenance of intervertebral region. 第41回日本発生生物学会 2008 年 5 月 28 日～30 日、徳島
- ⑨ 猪早敬二、高野吉郎、工藤明: 脊椎骨融合を示すダルマメダカ変異体の原因遺伝子の解明 Analysis of the Dharma-medaka mutant, which shows a defect in formation of vertebral column、日本動物学会第 79 回大会 9月5日～7日 福岡大学
- ⑩ 八木優子、須田直人、森山啓司、山越康雄、馬場麻人: Enamel matrix derivative (EMD)の歯根吸収抑制活性はアモロゲンinが担う。第 67 回日本矯正歯科学会大会、2008 年 9 月 16-18 日、千葉。
- ⑪ 馬場麻人、太田正人、寺島達夫、田畑 純、高野吉郎: ラット歯髄におけるFGF18 の発現: *in situ* RT-PCRによる検出。第 50 回歯科基礎医学会、2008 年 9 月 23-25 日、東京。
- ⑫ Atukorala ADS, Higuchi K, Tabata MJ, Baba O, Mitani H , Takano Y: Impaired Tooth Development In Reduced Scale Medaka Mutant. 56<sup>th</sup> General Session of the JADR,

Nov29-30, 2008, Nagoya, Japan.

- ⑬ Notani T, Tabata MJ, Baba O, Takano Y: Three-dimensional & layered culture method for tooth induction and development. 56<sup>th</sup> General Session of the JADR, Nov29-30, 2008, Nagoya, Japan.
- ⑭ Ahmad M, Iseki H, Baba O, Tabata MJ, Takano Y: Provisional mineralization layer in the preentin of murine teeth 56<sup>th</sup> General Session of the JADR, Nov29-30, 2008, Nagoya, Japan.

[図書] (計4件)

- ① 高野吉郎(分担): 新・う蝕の科学 浜田茂幸, 大島 隆編, 医歯薬出版, 2006.
- ② 高野吉郎(分担): 口腔組織・発生学, 医歯薬出版, 2006.
- ③ 高野吉郎(分担): 染色・バイオイメージングの実験ハンドブック, 羊土社, 2006.
- ④ 高野吉郎(監約): リープコット 歯科学のための解剖学, 西村書店, 2006.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高野 吉郎 (TAKANO YOSHIRO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 90126425

### (2) 研究分担者

田畑 純 (TABATA MAKOTO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号: 20243248  
馬場 麻人 (BABA OTTO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 90251545  
井関 八郎 (ISEKI HACHIRO)  
東京医科歯科大学  
技術専門職員  
研究者番号: 00401373