

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791342
 研究課題名（和文） 歯の上皮-間葉相互作用の人工構築とシグナル伝達のイメージング解析
 研究課題名（英文） Construction of the imaging systems and structure of dental tissues to analyze the epithelial- mesenchymal interactions in vitro.
 研究代表者
 田巻 玉器（YOKOHAMA-TAMAKI TAMAKI）
 北海道医療大学・歯学部・助教
 研究者番号：50397709

研究成果の概要：歯の発生は上皮間葉相互作用により進行するため、由来の異なる2つの細胞を *in vitro* で長期的に同時に観察できる系が望まれる。本研究はこれを実現するための基礎研究として、歯胚より分離した細胞の未分化性を維持する分子の検索と培養条件の検索を行った。その結果、上皮細胞が発現する Fgf9 が歯の間葉細胞の増殖に働くと共に間葉側での持続的な Fgf10 の発現に働くことで細胞の未分化性を維持することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：形態系基礎歯科学

科研費の分科・細目：若手研究（B）

キーワード：歯の発生、上皮間葉相互作用、幹細胞、再生、Fgf9、Fgf10、DNA array、stem cell niche

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究開始当初の歯の再生に向けた組織工学的研究では胎生期のラットや豚の歯胚、もしくはヒトの脱落した乳歯の細胞などが利用されていた。一方マウスの切歯歯胚は唇側面の形成端部に上皮組織が球状にふくらんだ場所が存在し、内部には組織型幹細胞が存在していることが示されている。この点において齧歯類の切歯は細胞の新たな供給源として有用であると考えられた。マウスの切歯歯胚では生後においても歯の組織型幹細胞の存在領域が明瞭であるために、切歯より上皮系幹細胞と間葉系幹細胞を分離し、効率的に増殖することが可能となれば十分な細胞数が得られると考えられた。

(2) 組織型幹細胞の存在する領域では、幹細胞の分化能を維持するための微小環境を形成していることが示されている。近年では表皮、小腸陰窩、骨髄などにおいて古典的な成長因子やシグナル分子が複雑なクロストークを形成していることが示されてきた。よって歯の細胞の未分化性を維持した状態での細胞培養の条件を検討するにあたって、*in vivo* の幹細胞ニッチで発現している分泌タンパクを参考にして検討することが有効であると考えられた。

(3) 歯の発生は上皮間葉相互作用によって進行する。時々刻々と変化する細胞の連続的な事象を観察するために時系列に沿った組

織学的手法や、器官培養法による研究が行われてきた。しかし *in vitro* において由来の異なる細胞間の相互作用をより詳細に観察するためには上皮細胞と間葉細胞を極性を持った状態で共存培養できるシステムの確立が必須であった。

2. 研究の目的

本研究では歯の再生を目指した上皮-間葉相互作用の人工構築と、上皮間葉相互作用によって誘導されるシグナル伝達を観察するためのシステム構築を目標とする。以下に細分化し3項目を挙げる。

(1) マウス切歯から分離切除した上皮系幹細胞と間葉系幹細胞を効率的に増殖させる培養条件を確立する。

(2) 培養した歯の細胞を用いて立体的な共存培養を行い、人工的な歯の上皮-間葉組織を構築する。

(3) 長期培養を行い、経時的に上皮間葉相互作用によって誘導させるシグナル伝達分子の発現を観察するためのシステムを構築する。

3. 研究の方法

(1) マウス切歯の幹細胞ニッチを構成するシグナル分子の網羅的解析

① PCRアレイ (SABiosciences 社製 Mouse Growth Factors PAMM-041C) を用いてマウス切歯歯胚上皮の形成端部に発現している分泌タンパクについて網羅的検索を行った。

② 上記アレイの結果より発現量が高かった分泌タンパクについて RT-PCR 法によって再度歯胚での発現を確認すると共に、*in situ* hybridization 法と免疫組織化学法によって組織切片による歯胚における局在を確認した。

③ 上記アレイの結果と RT-PCR の結果をふまえて、候補因子の歯胚における機能解析を行った。アポトーシス、細胞増殖に対する影響について検討すると共に、これまでに歯胚の間葉側で持続的に発現することで歯の幹細胞維持に働くことが示されている分泌タンパクである Fgf10 の発現維持に働く因子についても検索を行った。検索方法にはリコンビナントタンパクをしみこませたビーズを歯胚から分離した組織の上に置いた状態で器官培養を行った。その後回収した組織についてアポトーシス細胞に特異的に結合する Annexin V 染色を施した。さらに Whole mount *in situ* hybridization によって Fgf10 mRNA の発現の有無について検討した。

(2) 歯の上皮系幹細胞と間葉系幹細胞の効率的な細胞増殖のための培養条件について

① リコンビナントタンパクを濃度別 (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) に加えた状態で歯胚由来の一次培養細胞を数日間培養し、細胞数の計測を行った。その結果から細胞増殖への影響について検討した。

② 切歯の幹細胞ニッチ領域から分離した一次培養上皮細胞を数種類の増殖因子を添加した培養液中で長期間培養した後、RT-PCR法により幹細胞マーカー遺伝子数種類の発現を確認した。

(3) 歯胚上皮細胞と間葉細胞と生体材料への適合性の検討

歯胚由来の細胞を様々な濃度のコラーゲン (Cellmatrix type1-A, 新田ゼラチン 0.05%, 0.1%, 0.3% コラーゲン) を使用した培地にそれぞれ単独に播種し、接着性と細胞の生存への影響について検討した。

(4) 生体材料上に培養した細胞を用いた三次元的培養方法

① 0.05%, 0.1% コラーゲンを使用した培地状に歯胚由来の上皮細胞と間葉細胞を共に播種し、数日間培養を行った。培養後の組織を固定したのち、蛍光色素が結合した抗体を使用して上皮細胞と間葉細胞をそれぞれラベルし、コンフォーカル顕微鏡を使用して細胞の形態や移動について検討した。

② コラーゲン培地と培養皿の形状を変えて歯胚由来の上皮細胞と間葉細胞を数日間培養したのち、上記と同様の方法を使用して観察を行った。

4. 研究成果

(1) PCRアレイとRT-PCRの結果から切歯の形成端部に存在する幹細胞ニッチでは上皮組織において数種類の分泌タンパクの発現が優位に上昇していた。そのうち特に Fgf9 mRNA のシグナルは *In situ* hybridization の結果から上皮組織の形成端部から前エナメル芽細胞にかけての未分化な上皮細胞の存在領域に陽性反応が限局していた (図1)。免疫組織科学の結果においても、同領域に Fgf9 タンパクの陽性反応が観察された (図1)。

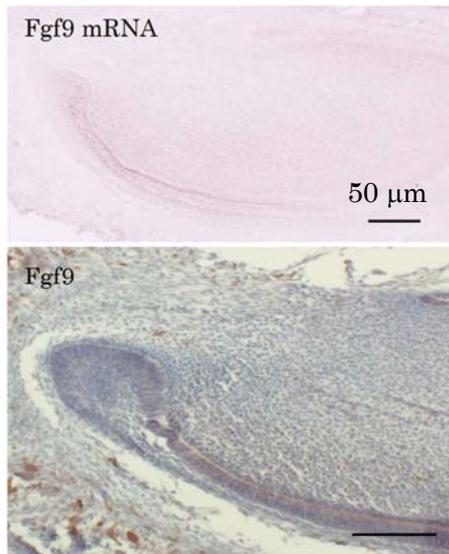


図1 切歯歯胚形成端部におけるFgf9 mRNAとFgf9タンパクの局在

(2) Fgf9タンパクをしみ込ませたビーズを歯の間葉組織上に置いた状態で器官培養を行った組織では、ビーズ周囲の間葉細胞においてAnnexin Vに陽性反応を示す細胞が、コントロールに使用したBSAをしみ込ませたビーズを使用した培養組織と比較して少なかった。さらに同様の培養を行った間葉組織では培養24時間後においてコントロール群では消失していたFgf10 mRNAの発現がFgf9タンパクを加えた群において維持されていた(図2)。



図2 歯胚間葉組織においてFgf9タンパクがFgf10 mRNAの発現誘導に与える影響

(3) 歯胚間葉組織由来の一次培養細胞培養にリコンビナントFgf9タンパクを加えた培養液中で、一週間ほど培養を行ったところ濃度依存的に細胞の増殖率が向上し

た(図3)。

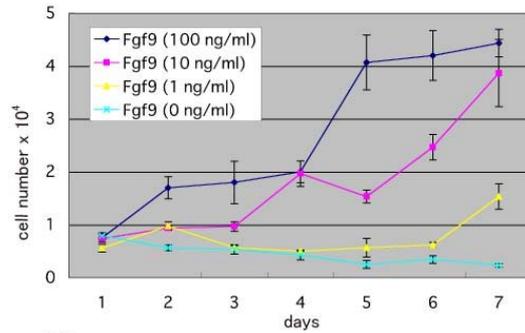


Fig.3

図3 Fgf9タンパクを加えて培養を行った歯胚由来間葉細胞数の経時的変化

(4) Fgf10タンパクをしみ込ませたビーズを歯の上皮組織の上に置いた状態で器官培養を行った組織では、ビーズ周囲の上皮組織においてFgf9 mRNAの発現が維持された(図4)。一方コントロール群ではFgf9 mRNAの発現は減弱、もしくは消失していた。

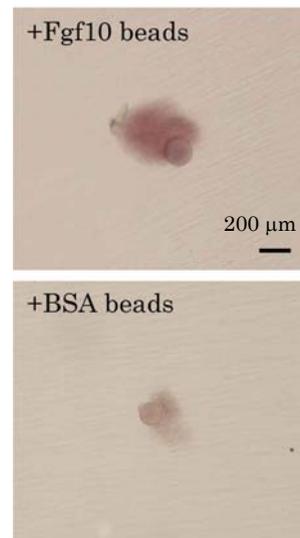


図4 歯胚上皮組織においてFgf10タンパクがFgf9 mRNAの発現誘導に与える影響

上記(1)～(4)の結果からマウス切歯歯胚の未分化領域における上皮組織で発現しているFgf9は、上皮に接した場所に存在する間葉細胞の増殖に働くと共にアポトーシスを抑制することが示された。さらに切歯形成端部で保存されている歯の幹細胞ニッチはFgf9-Fgf10のシグナルを介した上皮間葉相互作用によって保存されていることが新たに示唆された。また歯胚の形成端部より分離した間葉細胞をin vitroで早期に増殖させる場合において、培養液中へのFgf9タンパクの添加が有効であることが示唆された。

(5) 切歯の幹細胞ニッチ領域から分離した一次培養上皮細胞は神経系幹細胞の培養液に数種類の増殖因子を添加した状態で長期間培養が可能であり、培養後においても数種類の幹細胞マーカー遺伝子が発現していた。

(6) コラーゲンコートを行った培養皿では歯胚上皮由来の一次培養細胞の接着効率が上昇した結果、細胞の増殖速度が向上した。また増殖した上皮細胞はシート様に配列した状態で回収が可能であった。

(7) 歯胚から分離した間葉細胞をコラーゲンに播種した状態で数日間培養をおこなうと、間葉細胞は球形でコロニーを形成した状態で増殖している細胞集団と、紡錘形に変化した細胞が突起を伸張させて結合しネット様の組織を形成していた。

上記(5)～(8)の結果かから *in vitro* において歯胚由来の一次培養細胞を未分化な状態を維持した状態で増殖させ、上皮細胞が極性をもった状態で回収する場合コラーゲンを使用した上記の方法が有効であることが示唆された。しかしながら *in vitro* において三次元的に培養を行った組織をコンフォーカル顕微鏡で観察する場合において、対象物の厚さや蛍光標識の抗体の組織深部に対する反応性に限界があり、上皮間葉組織の界面を観察することが困難であった。以上をふまえて培養細胞の観察方法について特に今後の課題としたい。

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)

- ① Tamaki Yokohama-Tamaki, Shibata S., Wakisaka S., Harada H.
The epithelial-mesenchymal interaction plays a role in the maintenance of the stem cell niche of mouse incisors via Fgf10 and Fgf9 signaling. The Open Biotechnology journal, 2, 111-115, 2008, 査読有り

[学会発表] (計3件)

- ① 田巻玉器 マウス下顎頭軟骨の発生過程におけるCartducinの機能, 第114回日本解剖学会・全国学術集会 シンポジウム 下顎頭軟骨(二次軟骨)の形成機構, 平成21年3月28日, 岡山理科大学(岡山市)
- ② 田巻玉器, 前田隆史, 柴田俊一 マウス下

顎頭軟骨の発生過程におけるCartducinの発現と機能解析, 第50回歯科基礎医学会, 平成21年9月24日, TOC有明コンベンションホール(京都)

- ③ Yokohama-Tamaki Tamaki Fgf-9 play a role for the maintenance of stem cell niche via Fgf-10 expression in the mouse incisors., 9th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation., 平成19年9月6日, Center of Zurich, North Hospital auditorium (Zurich)

[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

田巻 玉器 (YOKOHAMA-TAMAKI TAMAKI)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号: 50397709

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし