

機関番号：32404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592146

研究課題名（和文）頭頸部の胎生期組織の発生・成長・消失調節機構の解明

研究課題名（英文） Regulation mechanisms of development, growth and degeneration of craniofacial embryonic tissues.

研究代表者

天野 修 (AMANO OSAMU)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：60193025

研究成果の概要（和文）：マウスメッケル軟骨の消失過程では、軟骨細胞にアポトーシスは認められなかった。しかし成長期の側方成長側の軟骨膜に多数のアポトーシスが認められたこと、マウス下顎の器官培養系でアポトーシスを抑制するとメッケル軟骨の部分的な欠損が認められることがわかった。以上の結果から軟骨膜のアポトーシスは同部での軟骨芽細胞への間葉細胞からの分化に伴って発現し、メッケル軟骨の形態形成に必須であることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：The following findings were obtained in the development and degenerative processes of mouse Meckel's cartilage: apoptosis was not found in Meckel's chondrocytes; many apoptotic cells were found in the perichondrium of lateral growing aspect of the cartilage during the developing period; and organ-cultured mouse embryonic mandibles supplemented with an apoptotic depressant showed partial deficiency of Meckel's cartilage. These results strongly suggested that the apoptosis is involved in the differentiation of chondroblasts in the perichondrium and is essential for the morphogenesis of Meckel's cartilage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,200,000	960,000	4160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：発生、熱ショックタンパク、アポトーシス、メッケル軟骨、甲状舌管、歯肉

1. 研究開始当初の背景

頭頸部の発生では、胎生期に発生し存在するが、発生途上で消失して生後には存在しない多くの器官・組織がある。その代表的な例としてメッケル軟骨があるが、最近多くの先天異常を伴う遺伝子改変マウスを用いた実験や、実験的に胎生期の遺伝子発現を操作する実験発生学的な研究によって、メッケル軟骨に異常が生じることが明らかとなった。甲状腺などの内分泌器官の発生では、上皮が陥入して一旦は導管様

の索状構造物（甲状舌管）が出来るが、発生途上で消失してしまう。しかし、甲状舌管は消失せずに残存すると甲状舌管嚢胞などの原因となる。また、口蓋発生では、接合部の残存上皮が口蓋裂発生の原因と考えられている。以上のことは、胎生期組織の正常な発生と消失がその後の頭頸部の発生に重要な影響を与えることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、幾つかの消失する胎生期組織は

他の残存する組織発生とどこが異なるのか、その由来、成長、消失の調節機構を熱ショックタンパク質の発現変動の観点から追求しようとするものである。

3. 研究の方法

本研究では、マウスおよびラットの胎仔組織および比較対照のための生後の組織を試料として、免疫組織化学的染色による、熱ショックタンパク質および増殖・分化の指標となるマーカー、細胞死の形態学的検出を主に行う。さらに、その発現調節を遺伝子レベルで確認する。

以上の実験結果を踏まえ、推測される機能を確認するため、メッセル軟骨を含む第一鰓弓下顎突起および口蓋突起を器官培養する。培地に Hsp25 の遺伝子発現を抑制してその影響を調べる。

(1) マウスおよびラットの胎仔の Hsp25 免疫組織化学

およそ胎齢 10 日から出生までの各発生段階の胎仔を固定して、頭頸部の前頭断面および矢状断面の連続凍結切片、必要に応じて全身矢状断面の連続切片を作成し、Hsp25 の局在を免疫組織化学的に明らかにする。

動物には基本的にマウスを利用するが、免疫組織化学用一次抗体の作成動物種がマウスの場合、非特異的反応の出現を避けるためにラットを使用する場合がある。Hsp25 に対する抗体は、リン酸化の有無を確認するため、リン酸化 Hsp25 に対する抗体も利用する。

(2) Hsp25 と増殖標識との二重免疫染色

Hsp25 の機能の一つと考えられる増殖抑制との関連を調べるため、PCNA または Ki67 等の増殖マーカーに対する免疫組織化学を同時に施行し、蛍光法で発色させ、走査型レーザー顕微鏡で観察する。

(3) Hsp25 とアポトーシスの二重染色

Hsp25 の機能の一つであるアポトーシスの抑制との関連を調べるため、TUNEL 法による染色を同時に行って蛍光法で発色させ、走査型レーザー顕微鏡で観察する。

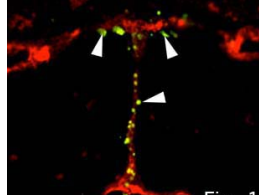
4. 研究成果

主に、熱ショック蛋白質の一つである Hsp25 の発現と、胎生期組織の消失に重要な役割を果たすと考えられているアポトーシスおよび増殖抑制との関連について、マウスおよびラットの成体・胎児を使用し、免疫組織化学的、実験発生学的に研究を行い、次のような結果を得た。

(1) 平成 20 年度

①熱ショック蛋白質によるアポトーシスの調節機構

口蓋発生における medial edge epithelium と甲状舌管の消失に関して、同部上皮の存在中には強い Hsp25 の発現・局在が継続的に観察されたが、発現の減弱または消失の場所・時期に一致してアポトーシスが生じ、細胞および組織が消失することがわかった（下図）。



マウス胎仔の口蓋癒合部。Hsp25 (赤) の陰性または減弱部位にアポトーシス (緑) が認められる。

②熱ショック蛋白質による上皮細胞の増殖抑制機構

歯胚および歯肉の発生に関して、上皮細胞に生じる Hsp25 は、同部の細胞増殖を抑制し、増殖活性と Hsp25 の発現は相反的であることが明らかとなった。歯胚の器官培養により、Hsp25 の発現抑制は細胞増殖の亢進による巨大な歯胚を生じたが、構成する上皮細胞の分化の進行にはほとんど影響しなかった。

③メッセル軟骨の消失機構

胎生期に消失するメッセル軟骨では、その消失過程ではアポトーシスはほとんど認められなかった。詳細は次年度。

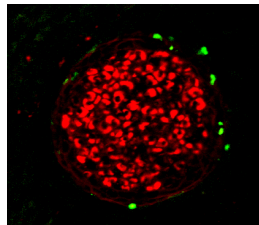
(2) 平成 21 年度

①Hsp25 による細胞増殖の調節機構

歯の萌出に伴う口腔粘膜から歯肉が分化する機構に関して、同部上皮の存在中には強い Hsp25 の発現・局在が継続的に観察されたが、発現の減弱または消失の場所・時期に一致して細胞増殖が生じ、歯肉特有の発現パターンに変化することがわかった。

②メッセル軟骨の消失機構

軟骨膜におけるアポトーシスは側方成長期に一致していること（下図）、II 型コラーゲン陰性の細胞にアポトーシスが認められる



マウス胎仔メッセル軟骨でのアポトーシス (緑) と II 型コラーゲン (赤) の二重染色像。図右側が外側。外側の II 型コラーゲン陰性の軟骨膜に多数のアポトーシスが認められる。

こと、器官培養系でアポトーシスを抑制すると軟骨の部分的な欠損が認められることが明らかとなった。以上の結果から軟骨膜のアポトーシスは同部での軟骨芽細胞への分化に伴って発現し、メッセル軟骨の発生に必須

であることが強く示唆された。

(3)平成 22 年度

①甲状舌管の発生と消失

マウス胎仔での甲状腺原基は、胎齢 11 日に舌根（この時期では未だ舌が未完成）に上皮の肥厚として生じ、同時に同部が TTF-1 免疫活性を呈する。TTF-1 免疫陽性の上皮索が下行して、頸部の甲状軟骨の前に到達すると同時に、上皮索（甲状舌管）の中央部から断裂が始まり、同時に同部付近からの TTF-1 免疫活性が消失した。舌骨原基軟骨は、甲状舌管消失後に形成された。甲状舌管はわずか 10 μm 以下の直径しか有さないことが分かった。また、断裂前には甲状舌管周囲に多数のアポトーシスが見られたが、甲状舌管の上皮組織には全く認められなかったが、消失直前時期におけるアポトーシスの局在はまだ十分に確認できなかった。

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）

〔雑誌論文〕（計 14 件）

- ① Sasaki A, Yamada T, Inoue K, Momoi T, Tokunaga H, Sakiyama K, Kanegae H, Suda N, Amano O: Localization of heat shock protein 27 (hsp27) in the rat gingiva and its changes with tooth eruption. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, 44, 2011, 17-24.
- ② Jitsuno M, Yokosuka A, Hashimoto K, Amano O, Sakagami H, Mimaki Y: Chemical constituents of *Lycoris albiflora* and their cytotoxic activities. *Nat Prod Commun*, 査読有, 6, 2011, 187-192.
- ③ Amano O, Doi T, Yamada T, Sasaki A, Sakiyama K, Kanegae H, Kindaichi K: Meckel's cartilage: Discovery, embryology and evolution. *J Oral Biosci*, 査読有, 52, 2010, 125-135
- ④ Ariyoshi-Kishino K, Hashimoto K, Amano O, Saitoh J, Kochi M, Sakagami H: Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by benzaldehyde. *Anticancer Res*, 査読有, 30, 2010, 5069-5076
- ⑤ Sakagami H, Kishino K, Amano O, Kanda Y, Kunii S, Yokote Y, Oizumi H, Oizumi T: Cell death induced by nutritional starvation in mouse macrophage-like RAW264.7 cells. *Anticancer Res*, 査読有, 2009, 29(1), 343-347.
- ⑥ Chu Q, Amano O, Kanda Y, Kunii S, Wang Q, Sakagami H: Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by

gefitinib in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Anticancer Res*, 査読有, 2009, 29(12), 5023-5031.

- ⑦ Thet MM, Yokote Y, Chu Q, Wang QT, Kishino K, Tamura N, Shimada J, Amano O, Kanda Y, Kunii S, Takekawa F, Hatano H, Shimada C, Hasegawa H, Sakagami H: Non-apoptotic cell death induced by nutritional starvation in J774.1 mouse macrophage-like cell line. *Anticancer Res*, 査読有, 2009, 29(12), 5083-5088.
- ⑧ 天野 修: メッケル軟骨の発生, 消失とその役割. *小児口腔外科*, 査読有, 18, 2008, 1-8.
- ⑨ 佐々木会, 山田 亨, 土居孝資, 岡安麻里, 徳永寛司, 鐘ヶ江晴秀, 天野 修: マウス胎仔の臼歯歯胚における熱ショックタンパク質 Hsp27 の局在. *明海歯科医学*, 査読有, 38, 2009, 58-66.
- ⑩ Liu Y, Sakagami H, Hashimoto K, Kikuchi H, Amano O, Ishihara M, Kanda Y, Kunii S, Kochi M, Zhang W, Yu G: Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by beta-cyclodextrin benzaldehyde inclusion compound. *Anticancer Res*, 査読有, 2008, 28(1A), 229-236.
- ⑪ Nakamura Y, Shimetani A, Fujii H, Amano O, Sakagami H, Takahashi K: Glutathione can efficiently prevent direct current-induced cytotoxicity, *J Endod*, 査読有, 2008, 34(6), 693-697.
- ⑫ Murayama H, Miyahara K, Wakabayashi H, Kurihara T, Hashimoto K, Amano O, Kikuchi H, Nakamura Y, Kanda Y, Kunii S, Motohashi N, Sakagami H: Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by benzocycloheptoxazines in human tumor cell lines. *Anticancer Res*, 査読有, 2008, 28(2A), 1069-1078.
- ⑬ Liu Y, Sakagami H, Amano O, Kikuchi H, Nakamura Y, Ishihara M, Kanda Y, Kunii S, Zhang W, Yu G: Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by peplomycin in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Anticancer Res*, 査読有, 2008, 28(4B), 2197-2204.
- ⑭ Kishino K, Hashimoto K, Amano O, Kochi M, Liu WK, Sakagami H: Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate. *Anticancer Res*, 査読有, 2008, 28(5A), 2577-2584.

〔学会発表〕（計 26 件）

- ① Bando Y, Sakiyama K, Inoue K, Adachi Y, Owada Y, Amano O: Localization of epidermal-type fatty acid binding protein (E-FABP) in the tibial epiphyseal plates of mice. The

- 116th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Yokohama, 2010/3.
- ② Inoue K, Bando Y, Takizawa S, Momoi T, Sakiyama K, Sakashita H, Amano O: Development and degeneration of mouse thyroglossal duct. The 116th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Yokohama, 2010/3.
 - ③ Momoi T, Bando Y, Inoue K, Sakiyama K, Owada Y, Suda N, Amano O: Localization of heart-type fatty acid-binding protein in oral muscles of mice. The 116th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Yokohama, 2010/3.
 - ④ 崎山浩司, 瀧澤将太, 坂東康彦, 天野修: IGF 遺伝子導入による培養筋芽細胞の特性変化第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会, 高知, 2010 年 11 月.
 - ⑤ 天野修: 唾液腺の解剖・組織から HSP まで. 第 34 回日本口腔外科学会教育研修会, 大阪府, 2010 年 8 月.
 - ⑥ 土居孝資, 桃井知子, 井上勝元, 佐々木会, 崎山浩司, 鐘ヶ江晴秀, 天野修: マウスメッケル軟骨の軟骨膜におけるアポトーシス. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会, 盛岡, 2010 年 3 月.
 - ⑦ 桃井知子, 崎山浩司, 井上勝元, 土居孝資, 佐々木会, 鐘ヶ江晴秀, 天野修: マウスメッケル軟骨における podoplanin の局在. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会, 盛岡, 2010 年 3 月.
 - ⑧ 佐々木会, 土居孝資, 井上勝元, 桃井知子, 崎山浩司, 鐘ヶ江晴秀, 天野修: メカニカルストレスを付与したラット歯根膜での Hsp27・Hsp 47 の局在と変動. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会, 盛岡, 2010 年 3 月.
 - ⑨ 井上勝元, 佐々木会, 土居孝資, 桃井知子, 崎山浩司, 坂下英明, 天野修: マウス甲状腺舌管の発生と消失における Hsp27 の局在. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会, 盛岡, 2010 年 3 月.
 - ⑩ 杉山完司, 中島敏明, 天野修: Bad と CA は NaF 誘導性アポトーシスに関与する. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会, 盛岡市, 2010 年 3 月.
 - ⑪ 天野修: 唾液腺の解剖・組織から HSP まで. 第 33 回日本口腔外科学会教育研修会, 東京, 2010 年 2 月.
 - ⑫ 坂上 宏, 天野修: α , β -不飽和ケトン類は, ヒト口腔扁平上皮癌細胞にミトコンドリアの障害を伴う細胞死を誘導する. 第 46 回日本口腔組織培養学会学術大会, 東京, 2009 年 12 月.
 - ⑬ 大槻純子, 杉山完司, 天野修, 安井利一, 坂上 宏: NaF 誘導性アポトーシスにおける Bad タンパク質の関与. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2009 年 9 月.
 - ⑭ 井上勝元, 土居孝資, 佐々木会, 崎山浩司, 坂下英明, 天野修: 熱ショックタンパク質 27 のマウス甲状腺舌管における局在. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2009 年 9 月.
 - ⑮ 土居孝資, 佐々木会, 井上勝元, 崎山浩司, 鐘ヶ江晴秀, 天野修: マウスメッケル軟骨の軟骨膜におけるアポトーシス. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2009 年 9 月.
 - ⑯ 崎山浩司, 井上勝元, 土居孝資, 佐々木会, 岩沼 治, 天野修: 舌癌が周囲筋線維に与える影響. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2009 年 9 月.
 - ⑰ 岸野香織, 橋本 研, 天野修, 坂上宏: ベンズアルデヒドによりヒト口腔扁平上皮癌細胞に誘導される細胞死の解析. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟, 2009 年 9 月.
 - ⑱ 佐々木会, 土居孝資, 井上勝元, 桃井知子, 崎山浩司, 鐘ヶ江晴秀, 天野修: 矯正力を付与したラット歯根膜での Hsp27・Hsp47 の局在と変動. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2009 年 9 月.
 - ⑲ 桃井知子, 崎山浩司, 井上勝元, 鐘ヶ江晴秀, 天野修: マウス Meckel 軟骨における podoplanin の局在. 第 51 回日本組織細胞化学会学術集会, 大津, 2009 年 8 月.
 - ⑳ 佐々木 会, 真野樹子, 成田亜希子, 松井成幸, 天野修, 鐘ヶ江晴秀: 矯正力を付与したラット歯根膜での Hsp27 の局在・変動. 第 68 回矯正歯科学会大会, 東京, 2009 年 7 月.
 - ㉑ 天野修: 解剖学者メッケルの一族. 第 114 回日本解剖学会全国学術集会, 2009 年 3 月, 岡山.
 - ㉒ 崎山浩司, 井上勝元, 岩沼 治, 阿部伸一, 井出吉信, 天野修: マウス舌癌周囲筋組織の筋線維特性. 第 114 回日本解剖学会全国学術集会, 岡山, 2009 年 3 月.
 - ㉓ 井上勝元, 佐々木会, 土居孝資, 桃井知子, 崎山浩司, 坂下英明, 天野修: マウス胎仔の甲状腺舌管の発生と消失における熱ショックタンパク質 25 の局在. 第 114 回日本解剖学会全国学術集会, 岡山, 2009 年 3 月.
 - ㉔ 土居孝資, 山田 亨, 佐々木会, 井上勝元, 鐘ヶ江晴秀, 天野修: マウスメッケル軟骨の軟骨膜におけるアポトーシスの役割. 第 114 回日本解剖学会全国学術集会, 岡山, 2009 年 3 月.
 - ㉕ 佐々木会, 山田 亨, 土居孝資, 井上勝元, 桃井知子, 鐘ヶ江晴秀, 天野修: 歯の萌出に伴う口腔粘膜上皮における Hsp27 の

局在の変化と細胞増殖との関連. 第 114 回日本解剖学会全国学術集会, 岡山, 2009 年 3 月.

- ㊦ 天野 修: 口腔顎顔面の組織発生・再生における熱ショック蛋白の役割. 第 21 回日本歯科医学会総会, 横浜, 2008 年 11 月.

[図書] (計 3 件)

- ① 天野 修 他: 医歯薬出版, 口腔解剖学 (井出吉信, 前田健康, 天野 修 編), 2009 年 11 月, 33-41 頁, 111-123 頁.
- ② 天野 修 他: 医歯薬出版, 人体の構造と機能, 2010 年 4 月, 32-44 頁.
- ③ 天野 修 他: 医歯薬出版, 歯・口腔の構造と機能, 2011 年 1 月, 2-9 頁.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 修 (AMANO OSAMU)

研究者番号: 60193025