

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10237

研究課題名(和文) 歯の発生過程における上皮間葉相互作用のプロテオミクスによる解明

研究課題名(英文) Analysis of epithelial-mesenchymal interactions during tooth development by proteomic approach

研究代表者

下村 淳子 (Shimomura, Junko)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：00386286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯の発生段階における役割の解明を目的とし、プロテオミクスを用いて選定した3種類のタンパク質の時間的・空間的な発現パターンとその機能解析を試みた。

胎生14、16日齢のマウス臼歯歯胚タンパク質を上皮と間葉組織に分けて回収し、質量解析を行い、その結果を解析した結果から、ATP5B、RACK1、およびCALRの3種類のタンパク質を選定した。さらに、選定したタンパク質を、免疫組織学的手法を用いて解析した。

免疫組織学的解析を行った結果、3種類のタンパク質は、エナメル質の発育段階に応じて各々のタンパク質が特異的なパターンで発現を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、3種類のタンパク質のエナメル質形成過程における局在の違いを確認できたことから、今後さらにより詳細な機能解析へと繋がられる点に大きな学術的意義がある。

また、本研究の成果は種々の因子に起因する歯の先天欠如や過剰歯、エナメル質形成不全症を含む形態異常歯など、小児歯科臨床上前問題となっている歯の発生・発育異常の発症メカニズムの解明に繋がることから、将来歯に障害がある小児の治療に大きく貢献でき、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using a proteomic approach, this study comprehensively analyzed protein expression in epithelial and mesenchymal tissues of the tooth germ during development.

First molar tooth germs from embryonic day 14 and 16 ICR mouse embryos were collected and separated into epithelial and mesenchymal tissues by laser microdissection. Mass spectrometry of the resulting proteins was carried out and three types of highly expressed proteins [ATP5B, RACK1, and CALR] were selected for immunohistochemical analysis.

The expression profiles of these proteins were subsequently evaluated during all stages of amelogenesis using the continuously growing incisors of 3-week-old male ICR mice. Interestingly, these three proteins were specifically expressed depending on the stage of amelogenesis.

研究分野：小児歯科学

キーワード：プロテオミクス 歯の発生 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

歯の発生過程で、Bone morphogenetic protein (BMP)、Fibroblast growth factor (FGF)、Sonic hedgehog (Shh)、Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family (Wnt) などの様々な因子が関与することが知られていた (Thesleff, 2003; Thesleff *et al.* 1999; Vanio *et al.* 1993)。これらの因子が引き起こす上皮間葉相互作用により、間葉組織にも BMP、Muscle segment homeobox、Paired 5 box gene など、様々な転写因子が発現し、歯胚形成が進む (Mina, 2001; Tucker *et al.* 1998&1999)。これらの報告から、歯の再生・再構築には上皮間葉相互作用が極めて重要であることが判ってきた。しかし、これらの報告は遺伝子レベルでの研究がほとんどで、タンパク質レベルにおいては免疫組織化学的手法に頼る部分が大きく、未知な部分が極めて多く残されており、これらの点を解明することが喫緊の課題であった。

研究代表者はこれまでに、マウスの下顎臼歯部における第二臼歯の発生過程において、Wnt シグナルの伝達機構(そのなかでも最もよく知られている  $\beta$ -カテニン経路)の影響と、Wnt シグナルに關与することが知られている主要な遺伝子群 (Fibroblast growth factor 10, Lymphoid enhancer-binding factor 1, Sox2, Axin2 など) の機能解析を行い、マウス臼歯歯胚の間葉組織における過剰な Wnt シグナルは第二臼歯の発生を阻害することを遺伝子レベルで確認した (Shimomura-Kuroki *et al.* Development, 2018)。しかし、Wnt から始まる歯の発生に關与するタンパク質については、未だにその詳細は明らかになっていない。そこで、研究代表者は、Wnt シグナル下流で最も重要な役割を担うタンパク質は何か、どのような役割で働き、発生のどの段階で発現するのかという疑問を持った。この学術的な「問い」の突破口に、研究代表者は今回プロテオミクスを用いた歯の発生過程に關わるタンパク質の網羅的・定量的解析を行うことを計画した。この解析で得られたデータから標的タンパク質を決定し、さらにパスイ解析(分子間相互作用の解析)および細胞内局在や動態を調べることによりその役割を明らかにしたい、というのが研究開始当初の背景である。

## 2. 研究の目的

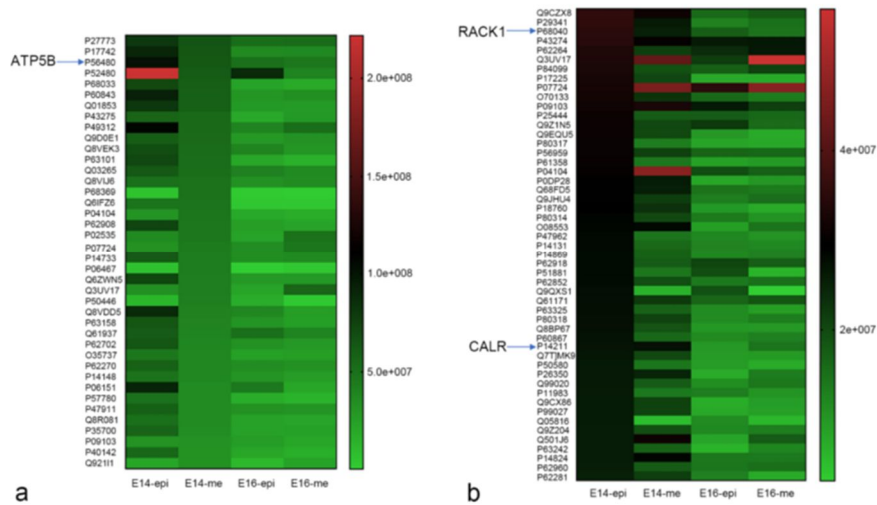
歯の発生に關わる研究は、その研究対象がパラクリンシグナル分子ファミリーなど、極めて小さいために、現在まで遺伝子レベルでの解析が行われているものの、タンパク質レベルではほとんど行われていない。研究代表者がこれまでにやってきた研究結果から、歯の発生過程においては、上皮間葉間におけるタンパク質と他タンパク質との相互作用が重要な機構であり、細胞間相互作用などの現象を解明するためには、遺伝子発現だけでなく、時空間的なこれらのタンパク質の発現を捉えることが極めて重要であると考えている。そのためには最も重要なタンパク質の同定とその発現時期並びに細胞内局在や動態を含む時空間的な役割の解明が必要不可欠である。この様な点で、本研究は極めて学術的で独自性の高いものである。

本研究の目的は、歯の発生機序を知るために、発生過程における上皮間葉間相互作用機構をタンパク質レベルで解明することである。本研究分野におけるタンパク質の動態については、未解明な部分が多いが、近年、タンパク質の発現を網羅的・定量的に検索できるプロテオミクスを用いた新たな展開が可能になってきた。研究代表者は、その分野の研究者との共同研究が可能となったことから、プロテオミクス技術と解剖学的・生化学的手法とを組合せて標的タンパク質を検索・解析することを計画した。

## 3. 研究の方法

胎生 14 (帽状期)、16 (鐘状期) 日齢のマウス頭部を浸漬固定し、脱水・パラフィン包埋後、10 $\mu$ m 厚の切片をレーザーマイクロダイセクション (LMD) 用の特殊なメンブレンスライド上に張り付けた (n=5)。その後、LMD を用いて、各日齢数の臼歯歯胚タンパク質を上皮組織と間葉組織に分けて回収した。回収した各タンパク質を精製した後、質量解析を行い、その結果を解析した結果から、ATP synthase subunit beta (ATP5B)、Receptor for activated C-kinase 1 (RACK1)、および Calreticulin (CALR) の3種類のタンパク質を選定した (図1)。さらに、選定したタンパク質の発現解析を、免疫組織学的手法を用いて行った。免疫組織学的解析には、胎生 12、14、および 16 日齢マウス臼歯歯胚、ならびに 3 週齢マウス上顎切歯を用いた。

なお、本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部動物実験倫理委員会の承認を得て行った (承認番号: 206)。

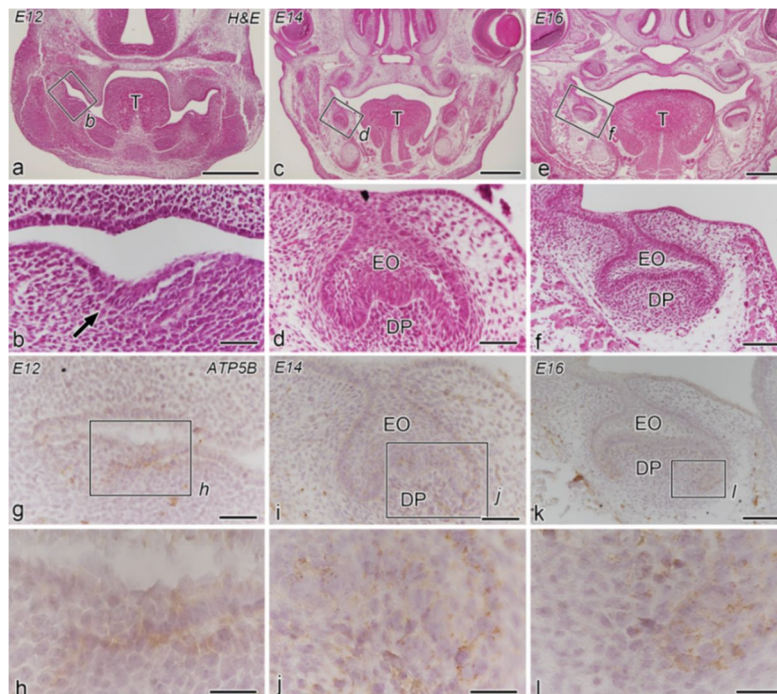


<図1> タンパク質最大発現量から 1/40 レベル (a) および a の最小発現量タンパク質以下 50 位まで (b) で選択されたタンパク質の Heat map 組織特異的な発現パターンと、その発現量から、ATP5B (P56480)、RACK1 (P68040)、および CALR (P14211) の3つのタンパク質を選択した。  
E14-epi、胎生 14 日上皮; E14-me、胎生 14 日間葉; E16-epi、胎生 16 日上皮; E16-me、胎生 16 日間葉。

#### 4. 研究成果

3 種類のタンパク質各々に特異的な抗体を用いて免疫組織学的解析を行った結果、胎生 12、14、および 16 日齢マウス臼歯歯胚において、3 種類のタンパク質各々異なる発現パターンを示した 図 2、3。また、生後 3 週齢マウス上顎切歯においては、エナメル質の形成段階に応じて各々のタンパク質が特異的なパターンで発現を認めた 図 4、5。

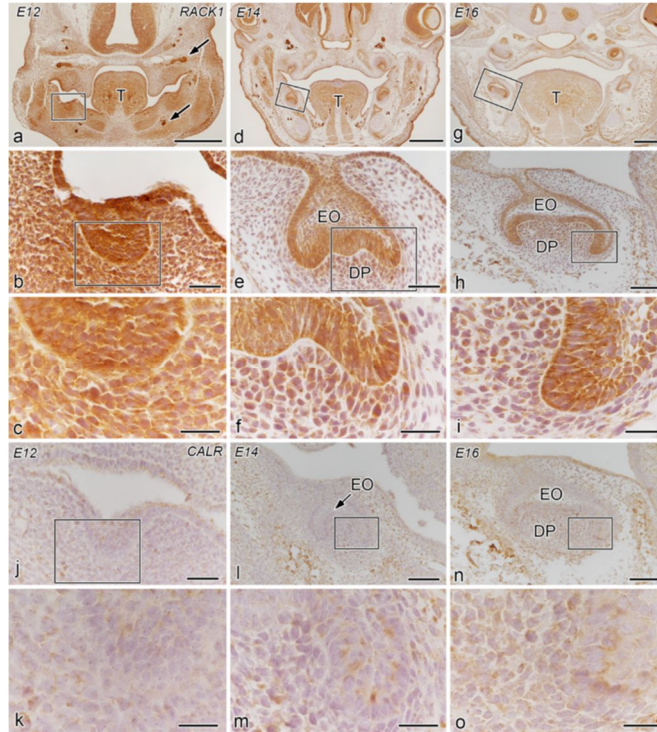
RACK1 は、歯の発生段階初期の増殖期および分化期で歯胚上皮および間葉組織で高度に発現を認めたが、ATP5B および CALR は、共に歯の発生段階初期のエナメル器で発現が弱かった反面、成熟期に強い発現を認めたが、齧歯類切歯に特有な鉄の沈着期では 2 つのタンパク質各々で異なる発現パターンを示した。



<図2> 胎生 12、14、および 16 日齢マウス下顎第 1 臼歯の H&E 染色・ATP5B 免疫染色所見 歯堤 (a, b)、帽状期歯胚 (c, d) および鐘状期歯胚 (e, f) が観察された。b, d, および f は、それぞれ a, c, および e の枠線内領域の高倍率像を示す。h, j, および l は、それぞれ g, i, および k の枠線内領域の高倍率像を示す。歯堤および cervical loop の上皮ならびにその下に存在する間葉細胞では、ATP5B 弱陽性反応を、また骨基質を囲む一部の間葉細胞では ATP5B 強免疫陽性反応を示した。

DP、齒乳頭； E0、エナメル器； T、舌。

Scale bar : 500 $\mu$ m ( a, c, e ) 100 $\mu$ m ( f, k ) 50 $\mu$ m ( b, d, g, i ) 25 $\mu$ m ( h, j, l )



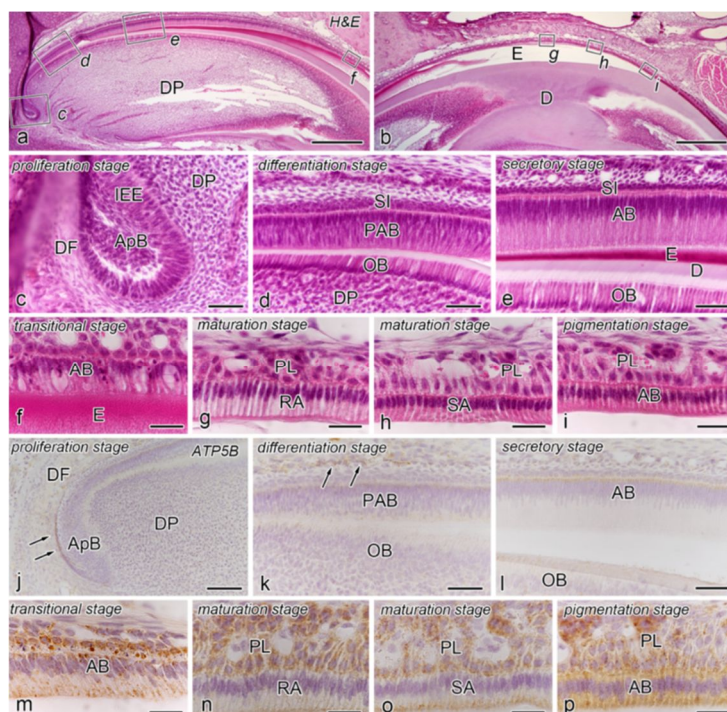
< 図 3 > 胎生 12、14、および 16 日齢マウス下顎第 1 臼歯の RACK1・CALR 免疫染色所見

b、c、e、f、h、および i は、それぞれ a、b、d、e、g、および h の枠線内領域の高倍率像を示す。RACK1 は、胎生 12 日齢 (a) の神経組織 (矢印) 脳、筋肉、皮膚、口腔上皮、および歯胚で強発現を認めた。同発現パターンは胎生 14 日齢 (d) でも認められたが、胎生 16 日齢 (g) では免疫反応が弱くなった。歯の発生過程が進むにつれ、RACK1 は歯胚上皮および間葉組織に局在化していった。鐘状期では、内・外エナメル上皮、齒乳頭、および骨基質を取り囲む間葉細胞において強い免疫反応を認めた。

k、m、および o は、それぞれ j、l、および n の枠線内領域の高倍率像を示す。歯堤および cervical loop の上皮およびその下に存在する間葉組織では、CALR 弱陽性反応を示したが、特定の間葉細胞で強い免疫反応が観察された。

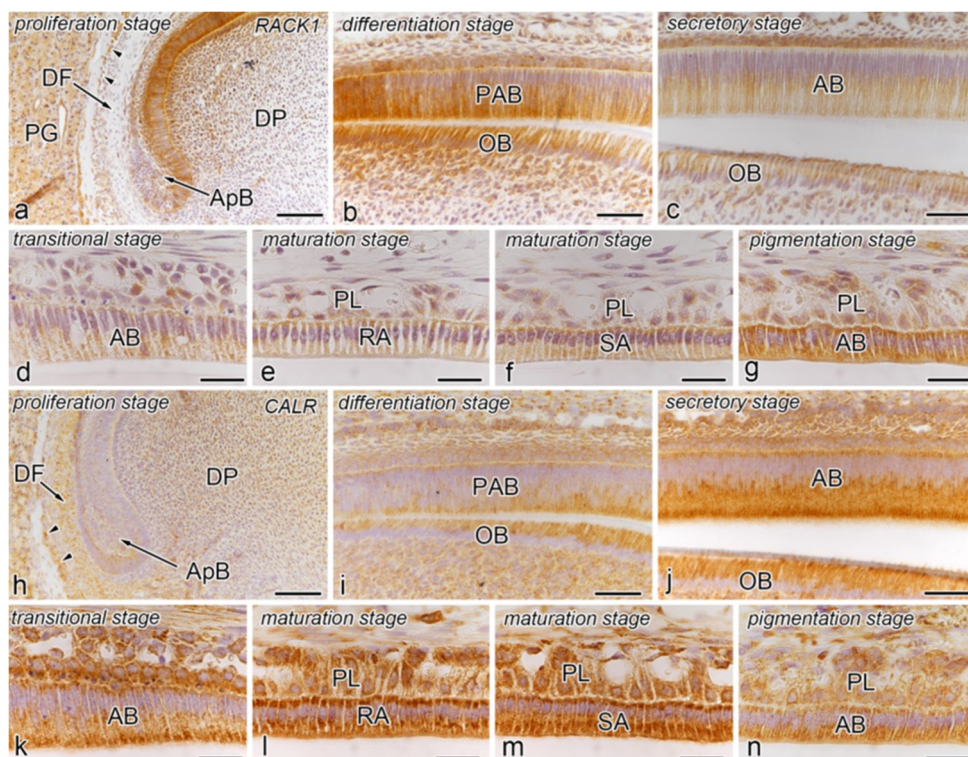
DP、齒乳頭； E0、エナメル器； T、舌。

Scale bar : 500  $\mu$ m ( a, d, g ) 100  $\mu$ m ( h, i, n ) 50  $\mu$ m ( b, e, j ) 25  $\mu$ m ( c, f, i, k, m, o )



< 図 4 > 3 週齢マウス上顎切歯の H&E 染色・ATP5B 免疫染色所見

上顎切歯の形成端側 (a) と切縁側 (b) の全体像を示す。c-i は a と b の枠線内領域の高倍率像を示す。エナメル質形成を、増殖期 (c) 分化期 (d) 分泌期 (e) 移行期 (f) RA (g) と SA (h) を含む成熟期、色素沈着期 (i) に分けて示す。Apical bud では ATP5B 弱陽性反応 (j, k: 矢印) が認められたが、歯乳頭では陽性反応を認めなかった。分泌期エナメル芽細胞の近心側には弱陽性反応を認めた (l)。移行期には強い免疫反応を示した (m) その後 RA と SA を除く乳頭層で強陽性反応を示した (n, o)。沈着期では、エナメル芽細胞やエナメル器の細胞に強い免疫反応が認められた (p)。  
 AB、エナメル芽細胞; ApB, apical bud; D、象牙質; DP、歯乳頭; DF、歯小嚢; E、エナメル基質; IEE、内エナメル上皮; OB、象牙芽細胞; PAB、前エナメル芽細胞; PL、乳頭層; SI、中間層。  
 Scale bar : 500 $\mu$ m (a, b) 100 $\mu$ m (j) 50 $\mu$ m (c-e, k, l), 25 $\mu$ m (f-i, m-p)



< 図 5 > 3 週齢マウス上顎切歯の RACK1・CALR 免疫染色所見

Apical bud の舌側、内エナメル上皮、星状網細胞、および歯乳頭周囲組織では RACK1 強陽性反応を示し、前象牙芽細胞の唇側、外エナメル上皮、骨周囲間葉細胞 (矢印) では弱陽性反応が認められた (a)。前エナメル芽細胞、中間層細胞、象牙芽細胞、および象牙芽細胞下層では強陽性反応が認められた (b)。分泌期エナメル芽細胞と象牙芽細胞等の間葉細胞では反応が弱かったが、中間層では強陽性を示した (c)。エナメル芽細胞を含むエナメル器では移行期および成熟期で弱陽性反応を示した (d-f)。沈着期では、エナメル芽細胞で強免疫反応を認めた (g)。歯乳頭、耳下腺、骨周囲間葉細胞 (h、矢印) さらに前エナメル芽細胞、エナメル器の細胞、象牙芽細胞等 (i) で、CALR 陽性反応を示した。エナメル器、エナメル芽細胞、および象牙芽細胞は、分泌期、移行期、および成熟期において強い免疫反応を示した (j-m)。色素沈着期において、エナメル器の免疫反応は低下した (n)。

AB、エナメル芽細胞; ApB, apical bud; DP、歯乳頭; DF、歯小嚢; OB、象牙芽細胞; PAB、前エナメル芽細胞

以上の結果から、RACK1 は、幹細胞ニッチを維持し、増殖細胞と分化細胞を提供する上で重要な役割を果たす可能性が示唆された。

これに対し、ATP5B と CALR は、歯胚におけるミネラル輸送と有機物の除去、さらに CALR は鉄の沈着にも関与している可能性が示された。

本研究の成果は、主に Odontology <https://doi.org/10.1007/s10266-023-00790-4> において国民に広く公開されている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayashi-Sakai Sachiko, Kobayashi Taichi, Hayashi Takafumi, Shimomura-Kuroki Junko, Sakai Jun, Sakamoto Makoto	4. 巻 34
2. 論文標題 Visual evaluation for the elasticity of suprahyoid muscles using sonographic elastography during tongue pressure measurement: A pilot study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 159 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/BME-221414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Satoshi, Karibe Hiroyuki, Kato Yuichi, Komatsuzaki Akira, Sekimoto Tsuneo, Shimomura-Kuroki Junko	4. 巻 33
2. 論文標題 Evaluation of eye movement patterns during reading of mixed dentition panoramic radiographs in dental students	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 33-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimomura-Kuroki Junko, Tsuneki Masayuki, Ida-Yonemochi Hiroko, Seino Yuta, Yamamoto Keiko, Hirao Yoshitoshi, Yamamoto Tadashi, Ohshima Hayato	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishing protein expression profiles involved in tooth development using a proteomic approach	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-023-00790-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 下村-黒木淳子	4. 巻 27
2. 論文標題 北欧の歯科事情	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 小児歯科臨床	6. 最初と最後の頁 42-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坂井幸子, 黒木淳子	4. 巻 109
2. 論文標題 少子化時代の小児歯科医療とバイオメカニカルアプローチ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 歯学	6. 最初と最後の頁 9-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 栗田沙由梨, 田中聖至, 三瓶伸也, 上津豪洋, 藤生桃, 下村-黒木淳子	4. 巻 59
2. 論文標題 2種類の歯牙腫の並存により乳犬歯が萌出障害をきたした1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児歯科学雑誌	6. 最初と最後の頁 131-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimomura-Kuroki Junko, Nashida Tomoko, Miyagawa Yukio, Morita Takao, Hayashi-Sakai Sachiko	4. 巻 62
2. 論文標題 Analysis of salivary factors related to the oral health status in children	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 226 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.18-0293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi-Sakai Sachiko, Kobayashi Taichi, Sakamoto Makoto, Hayashi Takafumi, Morise Yusuke, Nikkuni Yutaka, Takamura Masaki, Sakai Jun, Shimomura-Kuroki Junko, Ike Makiko, Nishiyama Hideyoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Quantitative evaluation of elasticity of lower orbicularis oris muscle during the lip closing measurement using sonographic elastography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 361 ~ 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/BME-201101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上津豪洋, 坂井幸子, 下村 - 黒木淳子
2. 発表標題 レーザー切削したウシ歯象牙質への試作オールインワンアドヒーズブの応用
3. 学会等名 第60回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上津豪洋, 中野智実, 田中聖至, 坂井幸子, 下村 - 黒木淳子
2. 発表標題 外傷受傷歯に断髄後ダイレクトベニア修復を行った1例
3. 学会等名 第40回日本小児歯科学会北日本地方会および総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田織恵, 北澤裕美, 瀧桃, 坂井幸子, 下村 - 黒木淳子
2. 発表標題 上顎両側犬歯の完全型移転を伴う1例
3. 学会等名 第40回日本小児歯科学会北日本地方会および総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村 - 黒木淳子
2. 発表標題 小児歯科医師としての現在・過去・未来 - 12年間の委員会活動を通して考える -
3. 学会等名 第60回日本小児歯科学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 下村 - 黒木淳子
2. 発表標題 齧蝕予防を再考する
3. 学会等名 公益社団法人日本小児歯科学会2022年度専門医セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下村-黒木淳子, 上津豪洋
2. 発表標題 プロテオミクスによる歯の発生に関わるタンパク質の網羅的解析
3. 学会等名 第58回日本小児歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤律子、梨田智子、水橋史、下村-黒木淳子、森田貴雄
2. 発表標題 シェーグレン症候群モデルマウスと若年および高齢マウスにおけるS100タンパク質の発現比較
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 白川 哲夫、福本 敏、岩本 勉、森川 和政、黒木淳子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 472
3. 書名 小児歯科学 第6版	

1. 著者名 新谷 誠康、木本 茂成、黒木 淳子、齊藤 一誠、齊藤 正人、島村 和宏、星野 倫範	4. 発行年 2023年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 584
3. 書名 第3版 小児歯科学 (ベーシックテキスト・クリニカルテキスト)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森田 貴雄  (Morita Takao)  (20326549)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授   (32667)	
研究分担者	大島 勇人  (Ohshima Hayato)  (70251824)	新潟大学・医歯学系・教授   (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------