

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21592331

研究課題名（和文） 歯胚形態形成におけるサイモシンペーター4を中心とした分子ネットワークの解明

研究課題名（英文） Functional analysis for molecular networks of thymosin beta 4 in developing tooth germ.

研究代表者

小林 家吉 (KOBAYASHI IEYOSHI)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：40243951

研究成果の概要（和文）：

マウス下顎第一臼歯の発生過程におけるサイモシンペーター4 (Tβ4) の機能的役割について検索した。胎生11日齢 (E11.0) 下顎器官培養下 Tβ4 アンチセンス オリゴ (AS S-ODN) による Tβ4 遺伝子発現阻害実験にて歯胚の有意な発育低下、および type II/III Runx2、nucleolin (Ncl) および歯原性因子の有意な発現低下を示した。Tβ4 は type II/III Runx2 および Ncl 発現調節を介して歯胚発生に関与していると考えられる。以上の結果より、Tβ4 は歯胚発生関連因子の発現調節による歯胚発生初期歯胚上皮の機能的役割に関わる新因子として捉えることができた。

研究成果の概要（英文）：

We examined the functional implications of Tβ4 in the developmental course of the mouse lower first molar. An inhibition assay using *Tβ4* antisense sulfur-substituted oligodeoxynucleotide (AS S-ODN) in cultured embryonic day 11.0 (E11.0) mandibles showed a significant growth inhibition of the tooth germ. The Tβ4 knockdown led to decreased expression levels of type II/III *Runx2* and *nucleolin (Ncl)* in the cultured E11.0 mandibles. Significant down-regulation of them was also observed in cultured mouse odontogenic epithelial cell. Tβ4 appears to play roles in tooth germ development via the regulation of the type II/III *Runx2* and *Ncl* expressions. These results provided new evidence that Tβ4 is involved in the functions of odontogenic epithelial cells in the early stage of tooth germ development by regulating the expression of odontogenesis-related genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：口腔病理学、歯の発生、基底膜

## 1. 研究開始当初の背景

歯胚の発生・発育を制御する因子は国内外において過去に多数報告されているが、我々は報告されていなかった因子を検出した(H. Yamaza, et al. Int. J Develop. Biol., 45 (4): 675-680, 2001)。本課題で取り上げるTβ4も、我々が歯胚発生過程での特異的発現様式を明らかにした遺伝子である(M Akhter, et al., Hist. Cell Biol. 124(3-4):207-13, 2005)。しかしながら、歯胚形成におけるTβ4機能的役割はまだ報告をみななかった。

## 2. 研究の目的

歯胚発生過程におけるTβ4を介したIV型コラーゲナーゼ matrix metalloproteinase (MMP)-2/-9 発現機構の存在について作業仮説をたて、「間葉組織への歯胚上皮伸展に必要な基底膜改造」および「象牙質・エナメル質形成に先立った基底膜改造」の調整因子であることを立証する。

さらに、Tβ4を介した歯胚発生初期における歯胚上皮の機能的役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 歯胚器官培養下、Tβ4ノックダウン法による機能解析。
- (2) 歯胚上皮・歯髄由来細胞株を用いたTβ4発現阻害による機能解析。
- (3) MMP-2/-9発現に関するTβ4調節機構の検索。
- (4) 歯胚器官培養下、Tβ4による歯胚形態変化の検索。

## 4. 研究成果

- (1) E11.0下顎およびE15.0歯胚の器官培養下Tβ4アンチセンスオリゴ(Tβ4 AS S-ODN)を用いてTβ4発現ノックダウンアッセイにより、歯胚発生初期の段階でTβ4はエナメル器の形成において重要な機能的役割を担っていることが予想された。同条件下E11.0下顎器官培養におけるmRNAの定量解析を行った所、Tβ4ノックダウンにおいてtype II/III Runx2およびDentin matrix protein 1 (Dmp1)の有意な発現低下を認めた。蛋白質レベルで、Tβ4 AS S-ODN処理した下Runx2発現は有意な低下を示していた。同材料歯胚において細胞増殖活性度をKi-67免疫組織化学染色で検索した所、Tβ4 AS S-ODN処理した歯胚とコントロールに有意な差はなかった。これより、細胞増殖ではなく、Runx2等発現調節による歯胚の形態形成にTβ4の関与が示

された。

- (2) E15.0歯胚の器官培養下Tβ4発現ノックダウンアッセイを行ったが、組織形態学的に歯胚の発育に著明な変化を呈さなかった。同材料のmRNA発現解析では、Tβ4 AS S-ODN処理によりtype II/III Runx2, Nucleolin, Dmp1およびmatrix metalloproteinase 2/9 (Mmp 2/9)の有意な発現低下を認めた。これら遺伝子発現低下がみられたが、E15.0における歯胚形態変化へのTβ4の明らかな影響を捉えられなかった。
- (3) 歯原性上皮細胞をTβ4 AS S-ODNで24時間処理した結果、コントロールに比較して細胞移動度の有意な低下を示した。また、Tβ4 AS S-ODNでE-cadherin mRNA高発現を有意に認めた。さらに、Tβ4 AS処理により同細胞のPro-Mmp 2分泌低下を認めた。これより、歯胚形態形成において細胞移動度およびtype IV collagen分解酵素Mmp 2分泌の調節にTβ4の関与が認められた。

## 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)

[雑誌論文] (計5件)

- ① 藤原弘明、小林家吉、清島保、永田健吾、和田裕子、大隈由紀子、塩塚真帆、木原禎子、坂井英隆、左側上顎に発生した石灰化嚢胞性歯原性腫瘍の1例、診断病理、査読有、28巻1号、2011、pp.117-121
- ② Honda JY, Kobayashi I, Kiyoshima T, Nagata K, Wada H, Ookuma Y, Fujiwara H, Shiotsuka M, Takahashi I, Sakai H, In situ expression of the mitochondrial ATPase6 gene in the developing tooth germ of the mouse lower first molar, Journal Molecular Histology, 査読有、Vol.42 No. 1, 2011, pp.83-90
- ③ Takahashi KF, Kiyoshima T, Kobayashi I, Xie M, Yamaza H, Fujiwara H, Ookuma Y, Nagata K, Wada H, Sakai T, Terada Y, Sakai H, Protogenin, a new member of the immunoglobulin superfamily, is implicated in the development of the mouse lower first molar, BMC Developmental Biology, 査読有、Vol. 10 No. 115, 2010
- ④ Akhter M, Kobayashi I, Kiyoshima T,

Nagata K, Wada H, Ookuma Y, Fujiwara H, Honda JY, Sakai H, In situ expression of 15 kDa interferon alpha responsive gene in the developing tooth germ of the mouse lower first molar, Journal of Molecular Histology, 査読有、Vol. 41 No. 4-5、2010、pp185-191

- ⑤ Ming Xie, Ieyoshi Kobayashi, Tamotsu Kiyoshima, Kengo Nagata, Yukiko Ookuma, Hiroaki Fujiwara, Hidetaka Sakai, In situ expression of ribosomal protein L21 in developing tooth germ of the mouse lower first molar, Journal of Molecular Histology, 査読有、Vol. 40 No. 5-6、2010、pp. 361-367

[学会発表] (計 7 件)

- ① 小林家吉、清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、塩塚真帆、坂井英隆、Thymosin beta 4 のノックダウンによる歯原性細胞の変化について、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月、横浜
- ② 和田裕子、塩塚真帆、清島保、小林家吉、永田健吾、藤原弘明、坂井英隆、歯胚形成過程における Thymosin b-10 の役割～Thymosin b-4 との比較検討～、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月、横浜
- ③ Maho Shiotsuka, Hiroko Wada, Tamotsu Kiyoshima, Ieyoshi Kobayashi, Kengo Nagata, Hiroaki Fujiwara, Ichiro Takahashi and Hidetaka Sakai, Expression pattern and possible function of thymosin beta-10 in developing tooth germ compared with thymosin beta-4, The 6th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science”, 2011 年 3 月、福岡
- ④ Yukiko Ookuma, Ieyoshi Kobayashi, Tamotsu Kiyoshima, Kengo Nagata, Hiroko Wada, Kazuaki Nonaka and Hidetaka Sakai, Functional implication of thymosin beta-4 in the morphogenesis of the tooth germ via the regulation of odontogenic gene expressions, The 6th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science”, 2011 年 3 月、福岡
- ⑤ 和田裕子、清島 保、小林 家吉、塩塚

真帆、永田健吾、大隈由紀子、藤原弘明、高橋一郎、坂井 英隆、マウス歯胚形成過程における Thymosin beta 10 と Thymosin beta 4 との発現様式の比較検討、第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010 年 9 月、東京

- ⑥ Yukiko Ookuma, Ieyoshi Kobayashi, Tamotsu Kiyoshima, Kengo Nagata, Hiroaki Fujiwara, Haruyoshi Yamaza, Kazuaki Nonaka, Hidetaka Sakai, Functional implication of Thymosin beta 4 in the tooth development, 88th IADR General Session, 2010 年 7 月、バルセロナ
- ⑦ 小林 家吉、清島 保、永田 健吾、大隈 由紀子、藤原 弘明、坂井 英隆、歯胚形成過程における Rpl21 および Ifrg15 の発現様式について、第 51 回歯科基礎医学会学術大会、2009 年 9 月、新潟

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 家吉 (KOBAYASHI IEYOSHI)  
九州大学・歯学研究院・准教授  
研究者番号：40243951

(2) 研究分担者

坂井 英隆 (SAKAI HIDETAKA)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号：80136499

永田 健吾 (NAGATA KENGO)  
九州大学・歯学研究院・助教  
研究者番号：90189134

清島 保 (KIYOSHIMA TAMOTSU)  
九州大学・歯学研究院・講師  
研究者番号：20264054