

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22592044

研究課題名(和文) 歯胚、歯牙形成細胞が合成するプロテオグリカン、ヒアルロン酸の構造と機能の研究

研究課題名(英文) Structure and function of proteoglycan and hyaluronan synthesized by tooth germ and tooth cells

研究代表者

柴田 俊一 (Shibata, Shunichi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80187400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：器官培養の系を用いて、鐘状期歯胚が合成するプロテオグリカンの構造解析を行った結果、上皮成分および間葉成分とも相当量の versican タイプの大型プロテオグリカンを合成、分泌していることが明らかとなった。また同時期の歯胚の上皮成分、間葉成分の両者に versican mRNA 発現が認められたが、発現パターンは空間的、時間的に変化していた。さらにヒアルロン酸合成酵素 (Has) 遺伝子の発現を検索したところ、上皮では主に Has3、間葉では Has2 が強く発現している事が明らかとなった。以上のことから versican およびヒアルロン酸が歯胚の形態形成に重要な役割を演じている事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Using organ culture system, we demonstrated that tooth germ at bell stage synthesized versican-type large chondroitin sulfate proteoglycan. In this case, both epithelial and mesenchymal components could synthesize versican-type proteoglycan. Using in situ hybridization system, we investigated versican mRNA expression in developing tooth germ, and demonstrated that versican mRNA showed spacial and temporal expression patterns during developmental process of tooth germ. We also investigated mRNA expression of hyaluronan synthase (Has) 1, 2, 3 in tooth germ. Has1 mRNA did not show significant expression, but Has2 mRNA was detected in mesenchymal components including dental papilla and interstitial spaces around tooth germ. Meanwhile, Has3 mRNA was mainly detected in epithelial components such as inner enamel epithelium and stellate reticulum. These results indicated that versican and hyaluronan play important roles in the formation process of tooth germ.

研究分野：解剖学

キーワード：歯胚 プロテオグリカン ヒアルロン酸 器官培養 in situ hybridization HA synthase versican

1. 研究開始当初の背景

プロテオグリカン(PG)は細胞外基質の主要な非コラーゲン性蛋白質であり、コア蛋白質に付着するグリコサミノグリカン(GAG)鎖の種類によって様々な種類が知られている。ヒアルロン酸(HA)はコアタンパクを持たない純粋なGAGとして存在する物質であるが、軟骨基質に存在するアグリカンや非軟骨組織に存在するパーシカンなどの大型PGとともに会合体を形成し、独特の弾性や、機械的外圧に対する抵抗性などの機能を有することが知られていた。またHA合成酵素(HA synthase: Has)がクローニングされ、HAの機能に関する研究は飛躍的に発展していた。

一方、歯の形成過程におけるPGあるいはHAの役割に関する研究は古くから行われているものの、多くは組織化学的手法を用いた形態学的研究やあるいは近年隆盛となっている遺伝子工学的的手法のみによる解析が大半であり、実際どのような構造のPGやHAが合成されているかという、タンパクレベル、糖鎖レベルの解析は、ほとんど行われていない状況であった。また歯の形成過程におけるHasの発現に関しては全く関心が持たれていなかったためこの研究を発想するに至った。

2. 研究の目的

各時期の歯胚あるいは歯牙形成細胞が合成するプロテオグリカン(PG)、ヒアルロン酸(HA)の種類、構造を器官培養とradio isotopeを用いたmetabolic labelingの系ならびにin situ hybridization法を用いた遺伝子発現や組織化学的手法で解析する。さらに糖鎖合成を阻害する β -xylosideの歯胚形成における役割を検索する。また歯胚発育におけるヒアルロン酸合成酵素(Has)の遺伝子発現を調べ、これらの分子の歯胚発育、エナメル質、象牙質形成における役割を検討する。またPGやHAの合成を制御する因子の解析を行い、in vivoでの応用を検討する。

3. 研究の方法

歯胚の器官培養法とradioisotopeを用いたmetabolic labelingの系を用いて、各時期の歯胚あるいは歯牙形成細胞が合成するプロテオグリカン(PG)、ヒアルロン酸(HA)の構造解析を行った。次いで β -xylosideを培地に加え、PGの糖鎖やHA合成を阻害したときの歯胚の構造変化を阻害されたPG, HAの構造変化と関連させて解析した。

またin vivoの解析方法として歯胚の発育過程における*versican* mRNAあるいは*Has1*, *2*, *3* mRNAの発現をDigoxigeninあるいは 35 S-UTP標識RNAプローブを用いたin situ hybridization法で検索を行った。さらに歯胚発育に関する*Has* mRNAの発現の変化に関してはリアルタイムPCR法による定量的解析も行った。

またビオチン標識ヒアルロン酸結合タンパクを用いた組織化学的手法により合成された

HA分子の局在も検索した。

4. 研究成果

(1)歯胚が合成するプロテオグリカンの種類および β -xylosideの歯胚形成に対する影響について

胎生16日のマウス歯胚(鐘状期)では上皮成分、間葉成分とも相当量の*versican*タイプの大型プロテオグリカンを合成、分泌しているほか、上皮成分はヘパラン硫酸プロテオグリカン、間葉成分はデコリン、パイグリカンタイプの小型プロテオグリカンをやはり相当量分泌している事が明らかとなった。また同時期の歯胚からtotal RNAを抽出しRT-PCRで*versican* mRNAの発現を確認したところ、上皮成分、間葉成分両者に発現が見られ、上皮成分の発現量は間葉組織のおよそ2/3ほどの発現がある事が判明した。糖鎖の構成を阻害する β -xylosideを培地に加えたところ、咬頭の発育不全等の形態異常が明瞭に認められた(図1)。

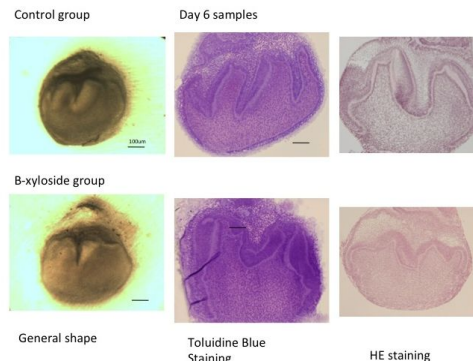


図1 β -xyloside添加時の変化

(2) *Versican* mRNAの歯胚における発現について

Versican mRNAの発現は、帽状期初期には上皮に強い発現が見られ、鐘状期に移るにつれ間葉組織に強い発現が認められるようになっていた(図2)

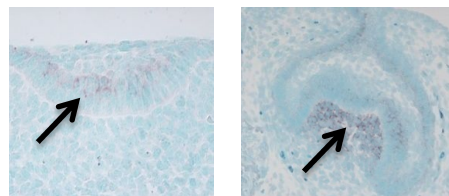


図2 *versican* mRNAの発現

器官培養の結果および(2)に見られた*versican*遺伝子の空間的、時間的に特徴的な発現から、パーシカンが歯胚の形態形成に重要な役割を演じている事が明らかとなった。

(3)歯胚における*Has*遺伝子の発現およびHA

分子の局在について

リアルタイム PCR 法により、*Has1* mRNA は歯胚では明瞭な発現を示さなかった。*Has3* mRNA の発現は歯胚の発育とともに経時的に増加する一方、*Has2* mRNA は減少していた。上皮と間葉を酵素処理によって分離し、遺伝子発現を検索したところ、*Has3* mRNA は上皮において、*Has2* mRNA は間葉において強い発現を示していた。in situ hybridization においてもリアルタイム PCR の結果を裏付ける所見が観察された。合成された HA 分子は上皮・間葉両者に局在が認められた (図 3)。

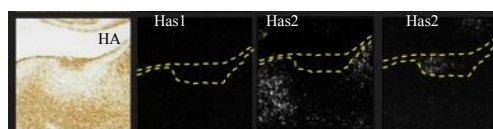


図 3 HA および *Has1*, *2*, *3* mRNA の発現

本研究により歯胚発育における、プロテオグリカン (versican) およびヒアルロン酸が重要な役割を演じている事が明らかとなった。今後はこれらの分子を応用した歯胚発育の制御機構の開発が期待される。

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 25 件)

1. Ikeda Y, Yonemitsu I, Takei M, Shibata S, Ono T. Mechanical loading leads to osteoarthritis-like changes in the hypofunctional temporomandibular joint in growing rats. Arch Oral Biol 59:1368-1378, 2014. (査読有)

doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.08.010.

2. Hayashi S, Kim JH, Hwang SE, Shibata S, Fujimiya M, Murakami G, Cho BH. Interface between intramembranous and endochondral ossification in human fetuses. Folia Morphol 73:199-205, 2014. (査読有)

doi: 10.5603/FM.2014.0029.

3. Shibata S, Sakamoto Y, Yokohama-Tamaki T, Murakami G, Cho BH. Distribution of matrix proteins in perichondrium and periosteum during the incorporation of Meckel's cartilage into ossifying mandible in midterm human fetuses - An immunohistochemical study -. Anat Rec 297:1208-1217, 2014. (査読有)

doi: 10.1002/ar.22911

4. Takahashi Y, Shibata S, Katori Y, Murakami G, Abe S, Rodríguez-Vázquez JF, Kawase T. Fetal development of the elastic-fiber-mediated entheses in the human middle ear. Ann Anat 195:441-448, 2013. (査読有)

doi: 10.1016/j.aanat.2013.03.010.

5. Hinata N, Murakami G, Abe S, Shibata S, Morizane S, Honda M, Isoyama T, Sejima T, Takenaka A. Coexistence of Elastic Fibers with Hyaluronic Acid in the Human Urethral Sphincter Complex: A Histological Study. J Urol 190:1313-1319, 2013. (査読有)

doi: 10.1016/j.juro.2013.04.023.

7. Kim JH, Parkkila S, Shibata S, Fujimiya M, Murakami G, Cho BH. Expression of carbonic anhydrase IX in human fetal joints, ligaments and tendons: a potential marker of mechanical stress in fetal development? Anat Cell Biol 46:272-284, 2013. (査読有)

doi: 10.5115/acb.2013.46.4.272.

8. Shibata S, Sakamoto Y, Baba O, Qin C, Murakami G, Cho BH. An immunohistochemical study of matrix proteins in the craniofacial cartilage in midterm human fetuses. Eur J Histochem 57:e34, 2013. (査読有)

doi: 10.4081/ejh.2013.e39

9. Shibata S, Cho KH, Kim JH, Abe S, Murakami G, Cho BH. Expression of hyaluronan (hyaluronic acid) in the developing laminar architecture of the human fetal brain. Ann Anat 195:424-430, 2013. (査読有)

doi: 10.1016/j.aanat.2013.07.002.

10. Shibata S, Sato R, Murakami G, Fukuoka H, Rodríguez-Vázquez, JF. Origin of mandibular condylar cartilage in mice, rats and humans: periosteum or separate blastema? J Oral Biosci 55: 208-216, 2013. (査読有)

doi: 10.1016/j.job.2013.08.001.

11. Shibata S, Fukuoka H, Sato R, Abe T, Suzuki Y. An in situ hybridization study of insulin-like growth factor system in developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible. Eur J Histochem 56:e23, 2012. (査読有)

doi:10.4081/ejh.2012.23.

12. Suzuki Y, Tsunekawa H, Obara N, Irie K, Shibata S. Expression and activation of β -catenin in developing and degenerated taste buds. 北海道医療大学歯学会雑誌 31(2)、2012年12月63-72頁. (査読有)

13. Suzuki Y, Obara N, Shibata S. Gene expression of insulin-like growth factor family during tooth development of the mouse. 北海道医療大学歯学会雑誌 31(1)、2012年6月1-9頁. (査読有)

14. Kawase T, Shibata S, Katori Y, Ohtsuka A, Murakami G, Fujimiya M Elastic fiber-mediated entheses in the human middle ear. *J Anat* 221:331-340, 2012. (査読有)
doi: 10.1111/j.1469-7580.2012.01542.x.
15. 柴田俊一 下顎頭軟骨の構造上の特徴—成長軟骨かつ関節軟骨-日本歯科医師会雑誌 65 (4)2012年 421-427. (査読無)
16. Katori Y, Shibata S, Kawase T, Cho BH, Murakami G. Transient appearance of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells in the midline epithelial seam of the human fetal secondary palate. *Cleft Palate-Craniofac J* 49:414-424, 2012. (査読有) doi: 10.1597/10-121.
17. Kim JH, Abe S, Shibata S, Arakawa S, Maki H, Murakami G, Cho BH. Dense distribution of macrophages in flexor aspects of the hand and foot of mid-term human fetuses. *Anat Cell Biol* 45:259-267, 2012. (査読有)
doi: 10.5115/acb.2012.45.4.259
18. Suzuki Y, K. Ikeda, K. Kawakami Development of gustatory papillae in the absence of Six1 and Six4. *J Anat* 219:710-721, 2011. (査読有)
doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01435.x.
19. Morita T, Tanimura A, Shitara A, Suzuki Y, Nezu A, Takuma T, Tojyo Y. Expression of functional Stim1-mKO1 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of an adenoviral vector. *Arch Oral Biol* 56:1356-1365, 2011. (査読有)
doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.06.001.
20. Yokohama-Tamaki T, Maeda T, Tanaka TS, Shibata S. Functional analysis of CTRP3/cartducin in Meckel's cartilage and developing condylar cartilage in the fetal mouse mandible. *J Anat* 218: 517-533, 2011. (査読有)
doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01354.x.
21. 柴田俊一 佐藤麗、田巻玉器、小原伸子、鈴木裕子 胎生期および生後マウス下顎頭軟骨における tenascin-C, fibronectinの免疫組織学的研究 北海道医療大学歯学会雑誌 30(1)、2011年6月 29-36頁. (査読有)
22. Jin ZW, Li CA, Kim JH, Katori Y, Shibata S, Murakami G, Cho BH. Fetal anatomy restricted to the eye mandible, and the pterygoid process of the sphenoid: A histological study. *Clinical Anat* 24: 599-606 2011. (査読有)
doi: 10.1002/ca.21135.
23. Jiang BZ, Yokohama-Tamaki T, Wang ZL, Obara N, Shibata S. Expression, localization and synthesis of versican by the enamel organ of developing mouse molar tooth germ: An in vivo and in vitro study. *Arch Oral Biol* 55:995-1006, 2010. (査読有)
doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.07.021.
24. Ikeda K, Kageyama R, Suzuki Y, Kawakami K. Six1 is indispensable for production of functional progenitor cells during olfactory epithelial development. *Int J Dev Biol* 4:1453-1464, 2010. (査読有)
doi: 10.1387/ijdb.093041ki.
25. Suzuki Y, Ikeda K, Kawakami K. Expression of Six1 and Six4 in mouse taste buds. *J Mol Hist* 41:205-214, 2010. (査読有)
doi: 10.1007/s10735-010-9280-8.
- 〔学会発表〕(計9件)
- 藤川芳織, 田巻玉器, 守田 剛, 柴田俊二: マウス下顎頭軟骨発生過程における Perlecan, DMP-1およびMEPEの発現に関する研究. 第56回歯科基礎医学会, 2014年9月25日-27日, 福岡国際会議場, 福岡.
 - 守田 剛, 田巻玉器, 藤川芳織, 柴田俊二: マウス臼歯歯胚の発生におけるヒアルロン酸合成酵素(HAS)の発現. 第56回歯科基礎医学会, 2014年9月25日-27日, 福岡国際会議場, 福岡.
 - Shibata S, Sato R. Tenascin-C immunostaining in rat molar periodontal ligament. 第62回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会, 2014年12月4日-5日, 大阪城ホール, 大阪.
 - Fukuoka H, Shibata S. Effect of α -xyloside on mandibular condylar cartilage formation. The 91st General Session & Exhibition of the IADR, with the 37th Annual Meeting of the CADR, March 20-23, 2013, Seattle convention center, Seattle, Washington, USA.
 - Shibata S. Effect of β -xyloside on tooth germ formation in organ culture system. International Symposium Frontier Meeting, Seoul/Jeonju 2013, February 12-15, 2013, Chonbuk National University, Jeonju, Korea.
 - Shibata S, Fukuoka H, Abe T. MEPE expression in developing mouse mandibular condylar cartilage. 第60回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会, 2012.12.14-15, 朱鷺メッセ 新潟.
 - 小原伸子, 入江一元, 柴田俊一: マウス歯胚におけるPrickle2の局在の蛍光抗体法による検出. 第54回歯科基礎医学会学術大会, 2012年9月14-16日, 奥羽大学, 郡山.

8. 福岡裕樹, 森山啓司, 柴田俊一: 下顎頭軟骨形成に対する β -xylosideの影響. 第54回歯科基礎医学会学術大会, 2012年9月14-16日, 奥羽大学, 郡山.

9. 天野 均, 井上利子, 龍 家圭, 田中政巳, 柴田俊一, 山田庄司: CCIラットにおける軟骨内石灰化不全に伴う頭蓋顔面異常に関する研究. 第53回歯科基礎医学会学術大会, 2011年9月30日-10月2日, 長良川国際会議場 岐阜.

〔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:
出願年月日:
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

柴田 俊一 Shibata Shunichi (東京医科大学・大学院医歯学総合研究科・教授)

研究者番号: 80287400

(2) 研究分担者

鈴木 裕子 Suzuki Yuko (北海道医療大学・心理科学部・教授)

研究者番号: 90137422

小原 伸子 Obara Nobuko (北海道医療大学・歯学部・講師)

研究者番号: 20183254