

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22592052

研究課題名(和文) 歯髄高次血管構築におけるTPOシグナル制御機構の時空的解析と臨床応用の検討

研究課題名(英文) Spatiotemporal analysis of a TPO signal control mechanism and examination of clinical application in pulp chamber high order blood vessel construction

研究代表者

春原 正隆 (Sunohara, Masataka)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：70287770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はTPO/MPL シグナルと血管形成関連遺伝子との相互作用の分子機構を明らかにし、歯髄再生の臨床応用の可能性を検討することを目的とし研究を行った。in situ hybridization法を用いて経時的なTPO/MPLシグナル関連遺伝子発現状況の解析を行った結果歯胚領域における時期特異的TPO/MPLシグナル関連遺伝子発現を認めた。他方in situ hybridization法を用いてVEGFR-2遺伝子の経時的発現状況の解析を行った結果時期特異的なVEGFR-2遺伝子の発現が歯胚領域に認められた。本研究結果が歯髄血管構築制御機構解明の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This research will clarify the molecular mechanism of interactions between TPO/MPL signals, blood vessel formation related gene, to consider the possibility of the clinical application of dental pulp regeneration purposes as research. using in situ hybridization, temporal analysis of TPO/MPL signal-related gene expression of results the tooth germ full time showed species-specific TPO/MPL signal-related gene expression. On the other hand, by using in situ hybridization analysis of VEGFR-2 genes over time of expression situation went, the tooth germ region observed period-specific VEGFR-2 gene expression. Expected results of this research will contribute pulp vascular development control mechanism.

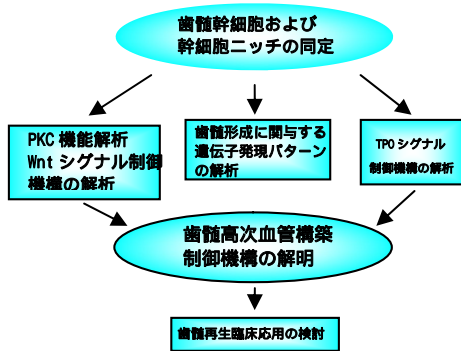
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学(含組織学・発生学) 歯髄 血管 トロンボポエチン

1. 研究開始当初の背景

歯髄高次血管構築における TPO シグナル制御機構の時空的解析と臨床応用の検討



生体各組織における「幹細胞」および幹細胞を取り巻く微小環境である「幹細胞ニッチ」における分化制御機構解明に関する研究が、再生医療の確立に向け脚光を浴びている。近年、骨髄における造血系幹細胞のニッチとして内骨膜領域の骨芽細胞性ニッチと類洞血管領域の血管性ニッチの2種類が同定され、造血幹細胞制御の分子メカニズムが明らかになった。歯科領域においては、歯の再生を目指した数多くの研究が行われているものの、歯胚の発生制御機構を解明するには至っていない。歯の発生には「幹細胞」、「増殖・分化制御因子」、「足場」の相互作用が不可欠であるため、上記各要素を明らかにするとともに、各要素間相互作用の分子メカニズムを解明することが歯の再生医療実現に向け急務であると考えられる。近年、多様な分化能を有する歯髄幹細胞の存在が報告されており、歯髄幹細胞の未分化性を維持する際の幹細胞および幹細胞ニッチ相互作用における分化制御機構の解明は、歯髄再生医療具現化の基盤となる重要な情報を提供するものと考えられる。

2. 研究の目的

申請者らは、本研究により歯髄幹細胞および幹細胞ニッチ相互間における時空間的(spatiotemporal)なWntシグナル制御機構の解明を基盤とし、歯胚領域における高次血管構築制御機構の基盤となる分子メカニズムを明らかにし、歯髄再生の臨床応用の可能性を詳細に検討することを目的とし研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 歯胚発生過程において歯髄形成に關与する各種遺伝子発現パターンの経時的発現状況の解析

in situ hybridization 法および免疫染色法により、歯胚発生過程において歯髄形成に關与する各種遺伝子発現パターンの経時的発現状況を解析するとともに歯髄幹細胞の増殖・分化を促進する因子の同定および各要素間の分子機構を解明する。

(2) 歯髄幹細胞におけるプロテインキナーゼCの機能解析およびWntシグナル制御機構の解析

歯髄幹細胞の増殖・分化制御機構におけるプロテインキナーゼCの機能解析および各種PKC isoformの発現に關与するWntシグナル伝達経路の解析を行う。

(3) 歯胚発生過程における血小板造血機構関連シグナル制御機構の解析

血小板造血機構に關与するシグナルの経時的発現状況を詳細に解析することにより、歯髄における高次血管構築制御機構の基盤となる分子機構の解明を目指す。

(4) プロモーターアッセイ法を用いたWntシグナル制御機構の解析

造血幹細胞の増幅に關与するとされるWnt3aのプロモーター領域のクローニングを行い、プロモーターアッセイ法を用いて歯胚発生過程におけるWntシグナル制御機構の解析を行う。

(5) 歯髄幹細胞とニッチ細胞間相互作用の分子メカニズムの解析

「足場」と歯髄幹細胞間相互作用に關与するシグナル伝達経路を同定し、その制御機構を解明し、臨床応用の可能性を検討する。

4. 研究成果

免疫染色法による各種蛋白の経時的発現状況の解析

胎生10.5日から18.5日齡のマウス胎児を用いて、歯胚領域における血小板造血機構に關与する各種蛋白の発現状況に關する経時的な解析を行ったが、TPOシグナル関連蛋白の明瞭なシグナルの発現は確認出来なかった。今後の方針としては、TPOシグナル関

連蛋白に関しては、現在市販されている抗体を用いての解析が困難であるため、明瞭な陽性反応を得るためには、染色法に関してさらなる工夫を加えるとともに、新規抗体を入手するかもしくは新規に抗体を作製し、TPO シグナル関連蛋白質の経時的発現状況に関し詳細に解析をすすめる、TPO シグナル関連遺伝子の経時的発現状況と詳細に比較検討することが必要であると考えられた。

***in situ hybridization* 法による各種遺伝子の経時的発現状況の解析**

マウスの歯胚領域における血小板造血機構関連遺伝子の発現状況に関する経時的解析を行うため、まずはじめに、TPO シグナル関連遺伝子のアンチセンスプローブおよびセンスプローブの作製を行った。作製したTPO シグナル関連遺伝子プローブに関して、ポジティブコントロール及びネガティブコントロールを用いてプローブが正常に work すること確認後、*in situ hybridization* 法を用いて、経時的に TPO シグナル関連遺伝子発現状況の解析を行った結果、時期特異的に TPO シグナル関連遺伝子の発現が認められたため、TPO シグナルが、歯胚発生過程において重要な役割を果たす可能性が示唆されたと考えられた。

他方、歯胚発生過程における血管形成過程の分子メカニズム解明をするにあたり、VEGFR-2 のアンチセンスプローブおよびセンスプローブの作製を行った。ポジティブコントロール及びネガティブコントロールを用いて作製した VEGFR-2 遺伝子のプローブが正常に work すること確認後、*in situ hybridization* 法を用いて VEGFR-2 遺伝子の経時的発現状況の解析を行った結果、時期特異的に VEGFR-2 遺伝子の発現が認められた。

今回の VEGFR-2 遺伝子経時的発現状況の結果をふまえ、Ang1/Tie2 シグナルとの相互作用の分子機構の解明および血小板造血機構関連シグナルとのクロストークに関して明らかにしたいと考えている。他方、これまで得られた各種 PKC- isoform の経時的発現状況の解析結果をふまえ、歯胚発生過程の血管形成過程におけるプロテインキナーゼ C 関与の可能性および Wnt シグナルとの関連についても、経時的に詳細に比較検討したいと考えている。

本研究が、歯髄における高次血管構築制御機構の基盤となる分子メカニズム解明の一助となることが期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 10 件)

- 1) 春原 正隆, 佐藤 巖 : Signaling pathways involved in the network formation of blood vessels during tooth development. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 講演プログラム・抄録集, p151, 2P-105(10190), 自治医科大学キャンパス、栃木、2014 年 3 月 28 日
- 2) 春原正隆, 佐藤 巖 : 歯の発生過程における重要な血管形成調節因子 Journal of Oral Biosciences Suppl., P39(P2-6), 2013. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 プログラム集 p39, 岡山コンベンションセンター、岡山、2013 年 9 月 22 日
- 3) M. SUNOHARA, H. Murata and I. SATO: Networking of signaling pathways involved in angiogenesis during tooth development, 46th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research with Scandinavian Division Florence, Italy, #180052, 0263, p72, 2013 年 9 月 6 日
- 4) Sunohara M: Role of PKC signaling during tooth development, 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会サンポートホール高松, 香川、2013年03月28日
- 5) Sunohara M: Signaling pathways involved in blood vessels formation during tooth development., 91st General Session & Exhibition of the IADR, Washington State Convention Center, Seattle Wash., USA, 2013年03月22日
- 6) Sunohara M: Regulation of blood vessels formation during tooth development., PER/IADR Congress & Exhibition Finlandia Hall, Helsinki, Finland, 2012年9月15日

7)Sunohara M: "The role of hematopoietic factors and Wnt signaling during tooth development" 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会. (20120327). 山梨大学甲府キャンパス,山梨県、 2012年3月27日

8)Sunohara M, Murata H, Sato I: Signaling pathway in blood vessels formation during tooth development. 35thAnnual Meeting of the German Society for Cell Biology Congress Program,65,2012年3月21日~2012年3月23日, Dresden, Germany

9)Masataka SUNOHARA: Identification of promoter elements regulating the expression of *c-mpl* gene induced by TPO.116th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists. (20110330). (震災の影響により、Journal of Physiological Sciences 誌による誌上開催となりました) 2011年3月30日

10)Sunohara M, Yatsu T, Murata H, Sato I : Analysis of regulatory motifs involved in TPO-induced *c-mpl* gene expression, 89th General Session & Exhibition of the IADR, San Diego, PROGRAM BOOK : 157, #2255, J Dent Res 90 A,2011年3月18日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

春原 正隆 (SUNOHARA, Masataka)
研究者番号 : 70287770
日本歯科大学・生命歯学部・准教授

(2)研究分担者

大西 和夫 (OHNISHI, Kazuo)
国立感染症研究所・免疫部・主任研究員
研究者番号 : 901690011

(3)連携研究者

()

研究者番号 :