

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5月28日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792052

研究課題名（和文） オートファジーが歯の形成に果たす役割について

研究課題名（英文） The role of autophagy in a tooth development

研究代表者

柳田 剛志（YANAGITA TAKESHI）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：90534793

研究成果の概要（和文）：

本研究はオートファジー（自食作用）という現象が、生体内の硬組織ができていく際にどのような役割を果たしているかを研究したものである。研究当初は歯の形成にどのような影響が及ぼされるのかについて、オートファジーのノックアウトマウスの歯を用いて研究を行ってきた。しかし、研究をすすめるに従って、歯そのものよりむしろ骨の形成にオートファジーが強く関与しているという所見を得た。この結果について学術論文等で発表する。また、本研究で調製したサンプルで研究期間内にいくつかの報告を行うことができた。

研究成果の概要（英文）：

This study is to be clear the role of autophagy in the process of hard tissue development, especially tooth. At first, we found the difference between tooth development of wild type mouse and that of ATG5 KO (autophagy blocked) mice. In other hand, we also noticed that the influence of autophagy is larger in bone tissue development rather than tooth development in my experiment process. These results were presented on academic journals and meetings.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：歯科矯正学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：オートファジー、発生、歯、骨組織

1. 研究開始当初の背景

個々の歯の形態形成や歯数の制御などのメ

カニズムの解明は、多くの顎顔面領域の先天性疾患の治療にかかわる矯正歯科学のみならず、歯科全般においても重要課題のひとつである。歯は上皮と間葉の複雑な相互作用（上皮間葉相互作用）によって形成され、最近の分子生物学と発生生物学の進歩により、その分子機構が飛躍的に明らかにされてきた。

ところで、オートファジーは細胞内の大規模なタンパク質分解機構であり、その不調により様々な疾患をもたらす事から、最近注目を集めている生命現象の一つである。細胞内での異常なタンパク質の蓄積を防いだり、過剰にタンパク質を合成したときや栄養環境が悪化した時にタンパク質のリサイクルを行い生体の恒常性維持に関与する。

我々の研究グループはこの現象に注目し、顎顔面の形成におけるオートファジーの果たす役割について検討してきた。しかしながら、オートファジーが歯の発生に果たす役割について検討されたことは、国内・国外を問わず無かった。

2. 研究の目的

オートファジーは細胞内の大規模なタンパク質分解機構であり、その不調により様々な疾患をもたらす事から最近注目を集めている生命現象の一つである。本研究はオートファジーが歯の形成に果たす役割について検討するものである。我々はオートファジーを阻害する ATG5 ノックアウト(以下 ATG5^{-/-})マウスの歯胚を用いて、その分子機構も含めて検討した。

3. 研究の方法

(1) LC3-GFP マウスの歯胚発生の組織学的観察

オートファジーを可視化した LC3-GFP マウスについても様々なステージの頭部薄切切片を作成し、蛍光顕微鏡で GFP の局在を観察し、歯の発生のどのステージで、どのような細胞種がオートファジーを起している

か観察した。

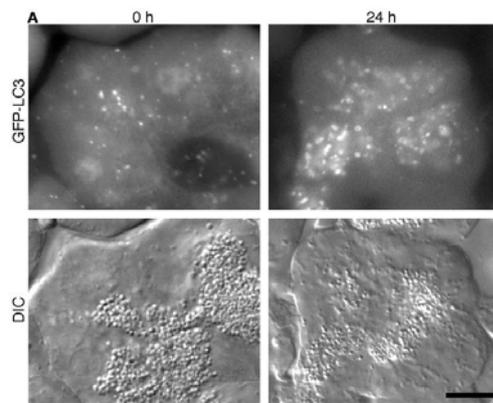


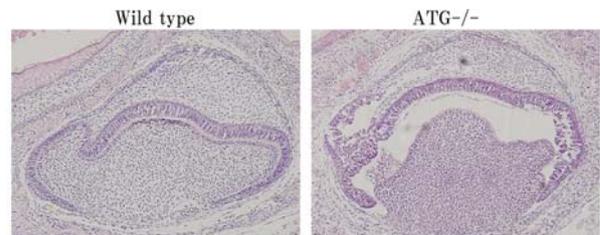
図2. LC3-GFPマウスを用いたオートファジーの可視化

(2) ATG^{-/-}マウスの歯胚発生の組織学的観察

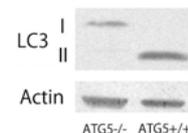
オートファジーを阻害した ATG5^{-/-}マウス胎児の頭部薄切切片を作成し HE 染色を行い、歯の発生のどの段階でこの様な表現系が起こるのかを詳細に検討した。また既に歯の発生に重要な役割を果たす事が知られている分子や、エナメル芽細胞や象牙芽細胞の分化マーカー等を用いて *in situ hybridization*, 免疫組織染色を行い、オートファジーが阻害された状態でどのような影響があるかを検討した。

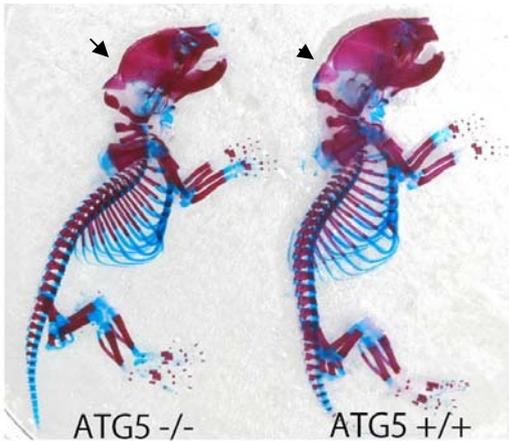
4. 研究成果

(1) 出生直後の ATG^{-/-}マウスの歯胚の薄切切片から同マウスのエナメル芽細胞と象牙芽細胞の間において細胞間接着に問題が生じており、歯胚の形成異常を見出した。

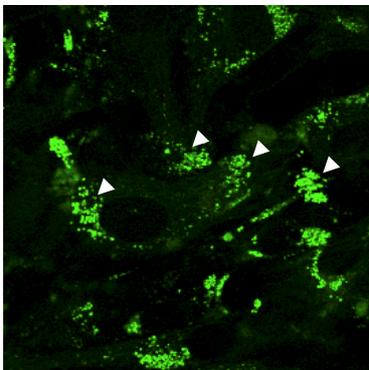


(2) 歯だけではなく、頭蓋骨の厚みが ATG^{-/-}マウスで減少することを見出した。



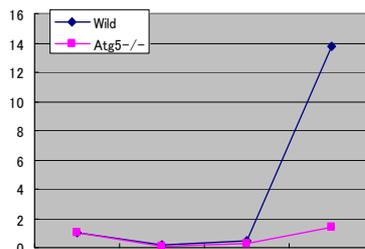


(3) LC3-GFP マウス頭蓋部切片の所見から、骨組織でもオートファジーが活性されていることを見出した。

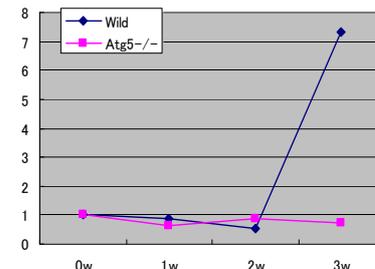


LC3-GFP マウス由来骨芽細胞

(4) *ATG5*^{-/-}マウスから単離した骨芽細胞でいくつかの骨分化マーカーの発現に異常が生じることが分かった。



Alkaline phosphatase 発現量



Osteopontin 発現量

(変動のあった分子の一例)

現在論文を作成中であり、詳細なデータは公表できないが、本課題において得られた結果は論文や学術発表において引き続き発表していく予定である。

また、今回の研究によってこれまで全く報告のない新たな視点から骨形態形成のメカニズムの一部が明らかになる可能性があり、今後注目される研究領域となる可能性が高い。

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 4 件)

①S Hayano, H Kurosaka, T Yanagita (他 10 人、3 番目) Roles of heparan sulfate sulfation in dentinogenesis, JBC, 査読有, in press, 2012

②N Kawanabe, S Murata, T Yanagita (他 9 人、5 番目) Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells, Experimental cell research, 査読有, 318;1247-1255, 2012

③H Kurosaka, Md. N Islam, T Yanagita (他 10 人、7 番目) Core Binding Factor Beta Functions in the Maintenance of Stem Cells and Orchestrates Continuous Proliferation and Differentiation in Mouse Incisors, STEM CELLS, 査読有, 29;1792-1803, 2011

④ T Yanagita, S Kuroda, T Takano-Yamamoto, T Yamashiro, Class III malocclusion with complex problems of lateral open bite and severe crowding successfully treated with miniscrew anchorage and lingual orthodontic brackets, Am J Orthod Dentofac Orthop, 査読有, 139;679-689, 2011

[学会発表] (計 2 件)

①早野暁、象牙質形成における Wnt シグナリ

ングとヘパラン硫酸の糖残基修飾、第 70 回
日本矯正歯科学会、2011. 10. 17-20、愛知

②中村政裕、骨形成におけるオートファジー
の関与、先端歯学スクール、2011. 9. 1、神奈
川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田 剛志 (YANAGITA TAKESHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：90534793

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者