

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792106

研究課題名(和文) 上皮間葉相互作用における Thymosin 10 と 4 の機能解析と歯の再生への応用

研究課題名(英文) The function of Thymosin beta 10 and 4 in the tooth development

研究代表者

和田 裕子 (WADA, HIROKO)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70380706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、以前、歯胚発生過程で特異的な発現様式を示すことを報告した Thymosin beta 4 (Tb4) と相同性の高い Tb10 の歯胚発生過程における発現様式と機能について解析した。IHS法を用いた Tb10 と Tb4 発現局在解析の結果、マウス歯胚発生過程において Tb10 は主に間葉組織の細胞増殖が活発な部位に発現していたのに対し、Tb4 は上皮組織に発現していた。Tb10 発現抑制実験において歯胚器官培養では、細胞増殖活性の低下と歯胚形態形成不良が認められ、歯原性細胞培養でも増殖活性が低下していた。以上の結果から、Tb10 は歯胚発生過程において形態形成に重要な役割を果たしている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study presents the expression pattern and functions of thymosin beta 10 (Tb10), a Tb4 homologue during the development of mouse lower first molars. An in situ signal of Tb10 was detected mainly in dental mesenchymal cells as well as in dental epithelial cells, while Tb4 was expressed in dental epithelial cells. An inhibition assay using Tb10-siRNA in E11.0 mandibles showed significant growth inhibition in the tooth germ. The number of Ki67-positive cells significantly decreased in the Tb10-siRNA-treated mandibles. The cellular proliferative activity was also significantly suppressed in Tb10-siRNA-treated cultured mouse dental pulpal and epithelial cells. These results indicate that developmental arrest of the tooth germ might be caused by a reduction in cell proliferative activity. The stage-specific temporal and spatial expression pattern of Tb10 in the developing tooth germ is indicative of multiple functions in the tooth development.

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・口腔病理学

キーワード：歯の発生 Thymosin beta 10 Thymosin beta 4

1. 研究開始当初の背景

歯の発生における上皮間葉相互作用が、「歯の再生」の具現化にはきわめて重要なステップであることが明らかになっている。また、「歯の再生医療」の実現のためには、歯の発生メカニズムの解明が必須であることが知られており、多数の研究室の取り組みにより多くの研究結果が報告されているが、未だ不明な点が多いのが現状である。

歯胚の発生・発育を制御する因子について、国内外において多数報告されているが、我々は、歯の発生初期において特異的に発現量の変化する遺伝子を cDNA subtraction 法を用い、これまでに報告されていなかった因子を網羅的に検出、同定し (*Int J Dev Biol.* 45(4):675-678, 2001) 歯胚発生過程における発現パターンや機能について報告してきた。その検出因子の一つである Thymosin beta 4 (Tb4) に関しても、マウス歯胚形成期における mRNA 発現様式を検索し、歯胚の形態形成に関連していることを明らかにした (*Histochem Cell Biol.* 124(3-4): 207-213, 2005)。

一方、Tb4 と高相同性を有する Thymosin beta 10 (Tb10) が知られている。Tb10 は、Tb4 と同じく G-actin binding domain を有しており、細胞の形態や運動などの重要な働きを担っている。また、神経系の発生、育毛促進や悪性腫瘍の形質など様々な生物学的活性があることが報告されているが、血管新生には抑制的に働くなど、Tb4 と異なる報告がある。このように様々な領域における Tb10 の機能についての報告がなされているが、歯科口腔領域における Tb10 の報告は非常に少なく、口腔癌に関するもの以外はほとんどない状態である。

そこで、我々はマウス胎生期 15.5 日齢 (E15.5) の歯胚における Tb4 と Tb10 の発現局在を in situ hybridization 法を用いて、比較検討したところ、Tb4 は主に上皮系細胞に強く発現を認める一方で、Tb10 は主に間葉系細胞に強く発現を認め全く異なる局在を示した。この結果から、歯の形態形成において不可欠なステップである上皮間葉相互作用において Tb4 と Tb10 が相互に、重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、歯胚発生過程における Tb10 の分子調節機構および機能を解析し、Tb4 との比較検討を行い、Tb10 と Tb4 が歯の上皮間葉相互作用および歯の形態形成にどのように関わっているか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) マウス胎生期から歯根形成期までの頭蓋顔面部組織を用い、in situ hybridization 法にて、下顎第 1 臼歯における Tb10 と Tb4 の mRNA 発現パ

ターンを検索し、比較検討した。

2) E10.5 および E12.0 のマウスから下顎を、E15.0、E18.0、P1、P5 から歯胚を採取し、Tb10 と Tb4 の発現量の変化を real-time PCR 法を用いて検討した。

3) マウスの E11 の下顎と E15 の歯胚を器官培養し、Tb10 に対する siRNA を Lipofection 法を用いてトランスフェクションし、Tb10 発現抑制を行い、歯胚形成への影響を組織形態学的に検索を行った。また、器官培養法で作成した連続切片を使用し、Ki67 免疫組織染色法と TUNEL 免疫組織染色法を用いて E11 の下顎と E15 の歯胚における Ki67 陽性細胞/全細胞と TUNEL 陽性細胞/全細胞の比率をそれぞれ算出した。

4) マウス歯髓細胞株 (mouse dental pulpal cell, mDP) とマウス上皮細胞 (mouse dental epithelial cell, mDE6) を培養し、Tb10 に対する siRNA を HVJ-envelop を用いてトランスフェクションし、Tb10 の発現抑制による歯原性細胞増殖への影響を検討した。また、mDP に siRNA を応用した Tb10 発現抑制実験群では、象牙質分化マーカーである Dentin sialophosphoprotein (DSPP) と Dentin matrix protein 1 (DMP1) の発現について real-time PCR により定量解析を行った。同様にして、mDE6 に siRNA を応用した Tb10 発現抑制実験群では、エナメル質分化マーカーである Amelogenin (Amel) の発現への影響を検討した。

4. 研究成果

1) マウス歯胚形成期における Tb10 と Tb4 の mRNA の発現局在

歯胚形成開始期 (E10.5) と歯原性上皮肥厚期 (E12.0) では、Tb10 は口腔上皮直下の間葉組織に著明に発現していた。また、わずかに口腔上皮細胞にも発現が認められた。一方、Tb4 は歯胚相当部の上皮細胞に発現が認められ、間葉組織中の血管にも発現が認められた。

蕾状期 (E13.5-E14.0) では、Tb10 は歯蕾上皮細胞周囲の間葉細胞に強く発現が認められた。対照的に、Tb4 は歯蕾上皮細胞に mRNA 発現が認められた。また、血管にも発現が著明に認められたが、歯蕾周囲の間葉細胞にはほとんど発現が認められなかった。

帽状期 (E14.5-E15.5) では、Tb10 は歯乳頭と歯小囊の間葉細胞に発現が著明に認められた。更に、エナメル器の外エナメル上皮にも発現が認められた。Tb4 は E14.5 では外エナメル上皮とエナメル結節 (PEK) に著明に発現が認められたが、E15.5 になると PEK での発現は減弱し、内エナメル上皮にはほとんどシグナルが認められなかった。

鐘状期前期 (E16.5-E18.0) では、Tb10 は内エナメル上皮に接する歯乳頭細胞に発現が認められ、特に将来咬頭部となる部位で強く発現が認められた。また、内エナメル上皮にも弱く発現が認められた。Tb4 は内エナメル上皮に発現が認められ、外エナメル上皮と歯堤細胞に発現が著明に認められた。

鐘状期後期 (P0-P1) では、Tb10 は P0 では、内エナメル上皮と前象牙芽細胞に発現が認められた。Tb4 は内エナメル上皮に著明に認められた。P1.0 になると、Tb10 は前象牙芽細胞と、前象牙芽細胞に面した前エナメル芽細胞に強い発現が認められた。一方、Tb4 は前エナメル芽細胞のみに発現が認められた。

歯冠部基質形成期 (P2-P3) では、Tb10 は基質形成前の前象牙芽細胞に強く観察され、基質形成後の象牙芽細胞での発現は減弱していた。また、基質形成前の前エナメル芽細胞においても著明な発現が認められた。その結果、歯胚側方部において互いに向かい合っている前象牙芽細胞と前エナメル芽細胞に Tb10 mRNA 発現が認められた。Tb4 mRNA は基質形成前の前エナメル芽細胞にのみ強い発現が認められた。

歯根形成期 (P5-P7) では、Tb10 は歯根部の前象牙芽細胞から分化期象牙芽細胞に発現が強く認められた。また、ヘルトヴィッチ上皮鞘とその周囲の間葉細胞にも発現が認められた。特に、ヘルトヴィッチ上皮鞘の内側の細胞より外側の細胞で発現が強く認められた。Tb4 はエナメル芽細胞での発現はほぼ消失しており、それ以外の部分でも発現は認められなかった。

歯根完成期 (P14) では、Tb10 はヘルトヴィッチ上皮鞘とその周囲の間葉組織のみに発現が認められた。Tb10 mRNA が発現している間葉細胞は歯髄側の細胞のみならず、歯根膜側の細胞にも認められた。歯冠部と歯根部に Tb4 mRNA の発現は認められなかった。

2) マウス歯胚形成期における Tb10 と Tb4 の mRNA 定量解析

下顎において、Tb10 と Tb4 mRNA の発現量は E10.5 よりも E12.0 で有意に増加した。

歯胚において、帽状期である E15.0 よりも鐘状期前期である E18.0 で Tb10 mRNA の発現量が一時的に減少した。また、歯冠部基質形成期である P1.0 では再度発現量が増加し、歯根形成期である P5.0 になると、発現量が再び減少した。同様の増減が Tb4 mRNA でも認められた。

3) 器官培養による機能解析

器官培養下における siRNA による Tb10 発現抑制効果

siRNA を用いて E10.5 下顎と E15.0 歯胚における Tb10 の発現抑制を行い、その抑制効果を real-time PCR 法にて検索した結果、下顎と歯胚ともに Tb10 siRNA 群では Untreated 群 (Ut 群) や Control 群 (Cont 群) と比較して

有意に Tb10 mRNA 発現抑制が認められた。

器官培養下 Tb10 機能抑制による E11.0 下顎と E15.0 歯胚の組織形態の変化

E11.0 下顎の器官培養 8 日経過後の Ut 群や Cont 群において、上皮は帽状を呈し PEK の発現が確認できた。また、エナメル器周囲の間葉細胞の集約が認められ、歯乳頭、歯小嚢の形成が認められた。一方、Tb10 siRNA 群では、エナメル器の形成は認められず、陥入上皮は蕾状呈していた。蕾状期歯胚の周囲の間葉細胞の集約は認められなかった。

E15.0 歯胚の器官培養 8 日経過後の Ut 群や C 群において、エナメル器は鐘状を呈していた。エナメル芽細胞や象牙芽細胞の分化は認められ、象牙前質の形成が認められた。一方、Tb10 siRNA 群では、エナメル上皮の歯乳頭方向への伸長が認められず、歯冠形態は鐘状を呈していなかった。しかしながら、エナメル芽細胞や象牙芽細胞の分化は Cont 群と同様に認められた。

器官培養下 Tb10 機能抑制による E11.0 下顎と E15.0 歯胚の細胞増殖への影響

培養した E11 下顎を用いて Ki67 免疫組織染色を行なった結果、Cont 群の歯胚では、PEK に陽性細胞が認められなかったが、エナメル器のその他の部位や間葉組織において散在性に陽性細胞が認められた。一方、Tb10 siRNA 群の歯胚においては、陽性細胞の局在性に偏りはなく、全体的に点在していた。また、Tb10 siRNA 群は Cont 群よりも歯原性間葉細胞の増殖抑制が有意に認められ、歯胚周囲の間葉細胞においても増殖能低下が認められた。上皮細胞においても、Tb10 siRNA 群が Cont 群よりも有意に減少した。

培養した E15 歯胚を用いて Ki67 免疫組織染色を行なった結果、Ut 群や Cont 群において、歯胚側方のエナメル上皮に陽性細胞が多く認められるのに対し、Tb10 siRNA 群ではエナメル上皮に陽性細胞が認められなかった。これより、上皮細胞では Tb10 siRNA 群における細胞増殖活性の有意な低下が認められた。歯乳頭組織においても、Tb10 siRNA 群の陽性細胞率は Ut 群や Cont 群と比較して有意に低下した。

器官培養下 Tb10 機能抑制による E11.0 下顎と E15.0 歯胚のアポトーシスへの影響

E11.0 下顎の Cont 群の歯胚上皮では TUNEL 陽性細胞が PEK に多く認められ、間葉細胞では散在性に認められた。一方、Tb10 siRNA 群では上皮と間葉ともに散在性に TUNEL 陽性細胞が認められた。Tb10 siRNA 群、Ut 群および Cont 群の TUNEL 陽性細胞比率には、全ての領域において差が認められなかった。

E15.0 歯胚の TUNEL 陽性細胞は、全ての群において、歯原性上皮細胞や間葉細胞で散在性に認められた。Tb10 siRNA 群、Ut 群および

び Cont 群の歯胚における TUNEL 陽性細胞比率は、全ての領域において差が認められなかった。

これらの結果より、Tb10 siRNA による歯胚の形態形成抑制は歯原性間葉細胞におけるアポトーシス発生の上昇ではなく細胞増殖抑制によるものであると考えられた。

4) 細胞培養下における siRNA による歯原性細胞増殖および分化への影響

mDP 細胞と mDE6 細胞を用いて Tb10 siRNA による Tb10 発現抑制効果を real-time PCR にて検索した結果、Tb10 siRNA 群は、Ut 群や Cont 群と比較して Tb10 mRNA 発現量が 50% 以上抑制された。

Tb10 機能抑制下における mDP 細胞と mDE6 細胞の細胞増殖活性は、両細胞において、Tb10 siRNA 群は、Ut 群や Cont 群と比較して有意に細胞数の低下が認められた。これより、Tb10 が歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞の細胞増殖活性に重要であることが示唆された。一方、mDP において Tb10 siRNA 群では、Ut 群や Cont 群と比較して象牙質分化マーカーである DSPP と DMP1 の発現に差が認められず、mDE6 において Tb10 siRNA 群では、Ut 群や Cont 群と比較してエナメル質分化マーカーである Amel の発現に差が認められなかった。

本研究において、Tb10 は主に間葉系細胞に強く発現を認める一方で、Tb4 は主に上皮系細胞に強く発現を認め、全く異なる局在を示した。また、Tb10 は細胞分化には影響がなく、細胞増殖活性を制御していることが明らかになった。以上の結果から、歯の形態形成において不可欠なステップである上皮と間葉の相互作用において Tb10 と Tb4 が相互に、重要な役割を果たしており、Tb10 は細胞増殖に関与している可能性が考えられた。

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 4 件)

Kiyoshima T., Fujiwara H., Nagata K., Wada H., Ookuma YF., Shiotsuka M., Kihara M., Hasegawa K., Someya H. and Sakai H. Induction of dental epithelial cell differentiation marker gene expression in non-odontogenic human keratinocytes by transfection with thymosin beta 4. *Stem Cell Res.* 12(1):309-22 (2014).

doi: 10.1016/j.scr.2013.11.006.

Shiotsuka M., Wada H., Kiyoshima T., Nagata K., Fujiwara H., Kihara M., Hasegawa K., Someya H., Takahashi I. and Sakai H. The expression and function of thymosin beta 10 in tooth

germ development. *Int. J. Dev. Biol.* 57(11-12):873-83 (2013).

doi: 10.1387/ijdb.120240hs.

Kiyoshima T., Nagata K., Wada H., Fujiwara H., Shiotsuka M., Kihara M., Hasegawa K., Someya H., and Sakai H. Immunohistochemical Expression of Thymosin B4 in Ameloblastomas and Odontomas. *Histol. Histopathol.* 28(6):775-86 (2013).

http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_28/28_6/28_6_775.htm

Ookuma YF., Kiyoshima T., Kobayashi I., Nagata K., Wada H., Fujiwara H., Yamaza H., Nonaka K., and Sakai H. Multiple functional involvement of Thymosin beta-4 in Tooth Germ Development. *Histochem. Cell Biol.* 139:355-370 (2013).

doi: 10.1007/s00418-012-1033-1.

[学会発表](計 7 件)

藤原弘明、清島保、永田健吾、和田裕子、坂井英隆. 非歯原性上皮細胞への Thymosin beta 4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞への誘導. 第 103 回日本病理学会・総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 口頭発表 26 日, ANA クラウンプラザホテル広島 (広島)

藤原弘明、清島保、永田健吾、和田裕子、木原槿子、長谷川佳那、染矢祐孝、坂井英隆. Thymosin beta 4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞の作製. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013 年 9 月 20-22 日, ポスター発表 22 日, 岡山コンベンションセンター (岡山)

染矢祐孝、清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、木原槿子、長谷川佳那、古谷野潔、坂井英隆. マウス歯肉上皮由来角化細胞への Thymosin beta 4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞誘導. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013 年 9 月 20-22 日, ポスター発表 22 日, 岡山コンベンションセンター (岡山)

塩塚真帆、和田裕子、清島保、永田健吾、藤原弘明、高橋一郎、坂井英隆. マウス歯胚形成を制御する Thymosin 10 の発現様式解析と機能解析. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2012 年 9 月 14-16 日, 発表 15 日, 奥羽大学 (福島)

清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、坂井英隆. エナメル上皮腫における Thymosin 4 の発現とその役割について. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2012 年 9 月 14-16 日, 発表 15 日, 奥羽大学 (福島)

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28-30日,
パシフィコ横浜(神奈川県)
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
28-30日, パシフィコ横浜(神奈川県)

〔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 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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 裕子 (WADA, Hiroko)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：70380706

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：