

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：32667  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23792117  
 研究課題名（和文）歯胚再生における甲状腺ホルモン作用機構の解析  
 研究課題名（英文）Analysis of the thyroid hormone function on the dental germ regeneration  
 研究代表者  
 三輪 容子 (MIWA YOKO)  
 日本歯科大学・生命歯学部・講師  
 研究者番号：80409218

研究成果の概要（和文）：甲状腺ホルモンは脊椎動物に共通して存在し骨形成と骨吸収を促進し骨代謝回転を高める作用を有することが知られている。本研究では再生能をもつ日本産アカハライモリの下顎骨歯槽部を損傷させ再生状況を詳しく検討した。甲状腺ホルモンレセプターの発現が増加していたことから顎骨再生において甲状腺ホルモンの関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Thyroid hormone plays important roles in bone metabolism for accelerating the resorption and formation in bone. The amputated mandible sites of Japanese newts (*Cynops pyrrhogaster*) were observed using molecular biology techniques. The expression of thyroid hormone receptor was significantly increased in the regenerated area of alveolar bone. These data indicate that thyroid hormones may affect the regeneration of alveolar bone in newts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

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：口腔解剖学（含組織学・発生学）

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類では器官再生臓器の分子機構解析では *in vitro* での研究が主体で *in vivo* では肝臓部分切除など一部の臓器・条件に限られ、顎顔面領域ではほとんど解明されていない。一方、両生類は四肢や眼球など幅広い器官で再生機能について分子レベルから観察されており、顎顔面領域でも顎骨を切除後に歯や歯周組織も含めた顎部がほぼ完全な形で再生することが報告されている Chosh S et al., *Int J Dev Biol.* 1994, 38, 479-490)。しかし、種間で再生能が異なり (Ferratti P and

Chosh S., *Developmental Dynamics* 1997, 210, 288-304) 再生の解析には多くの誘導経路が十分検討されていない。申請者は

これまで「両生類モデルを用いた歯の再生に関する分子機構の解明；平成 20、21 年度科学研究費補助金 若手 B 研究課題番号：20791345」で顎顔面部切断モデルを用いた再生過程を免疫組織学的・分子生物学的手法を用いて詳細に観察し歯胚の発生過程において血管内皮成長因子 VEGF が歯胚形成に関与している可能性を報告してきた (三輪容子, 佐藤巖：アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) 歯胚における VEGF の発現について, *Journal of Oral Biosciences*, 50 : 137, 2008)。また歯胚形成の関連因子の上流にある甲状腺ホルモンレセプター (THR) の存在が歯胚の形成に関わる必要性からアカ

ハライモリの組織中から THR のクローニングを行い mRNA の配列の一部を同定した。このホルモンはヒトと共通でありながら両生類では変態に大きく関与し、再生時には脱皮を誘発する因子と考えられており、器官再生への関与の可能性が高い。またヒト歯胚同様にエナメル形成期、象牙質形成期、石灰化期を経て形成されることに加え、一頭から発育段階が同時に観察できる多歯性歯胚を用いるイモリ (Kogaya Y. J Anat. 1999, 195, 455-465) を用いることで各段階でのレセプターの発現や個体形成因子が同時にしかも容易に観察できることから、歯胚再生・形成の分子機構解析を両生類モデルとして設定することは有用であると考えた。両生類のモデル動物としてよく使われているアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) では幼生オタマジャクシの段階のみ高い再生能力を有するが成体では低下する (Ferratti P and Chosh S., Developmental Dynamics 1997, 210, 288-304) ことが知られている。アカハライモリにおいては幼生期から成体を含むすべてのステージで再生能力が優れており、また日本の固有種であることから入手や飼育も容易である。アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を用いたことで変態の影響によらない器官再生実験系を設定することが出来た。

## 2. 研究の目的

歯胚の再生についてはマウス胎児より人工歯胚を培養し成体に移植し萌出に成功している (Ikeda E, PNAS. 2009, 106, 13475-13480)。しかし両生類では顎骨切除後には歯胚原器の有無に関わらず歯が形成されることから、歯胚原器を誘導する要素が再生時の顎骨に存在すると予測される。

甲状腺ホルモン (TH) は核に存在する甲状腺ホルモンレセプター (THR) を介してシグナル伝達を行い様々な物質の発現に関与している。近年 TH の関与する系が両生類の腸粘膜上皮細胞の増殖を促すことが報告されていることから顎骨や歯胚誘導細胞についても甲状腺ホルモン/レセプター (TH/THR) 系が顎骨の再生過程において関与している可能性を考えた。本研究では顎骨再生に伴う歯胚形成の上皮陥凹からエナメル質形成までの過程を、アミオダロンによる甲状腺レセプター阻害、T3 阻害剤投与を検討し (歯胚誘導マーカー (FGF, BMP4, Shh) と THR との発現を比較することで、歯胚再生に関与する細胞群のネットワークを構築し歯胚原器の誘導と再生までの機構を明らかにする。

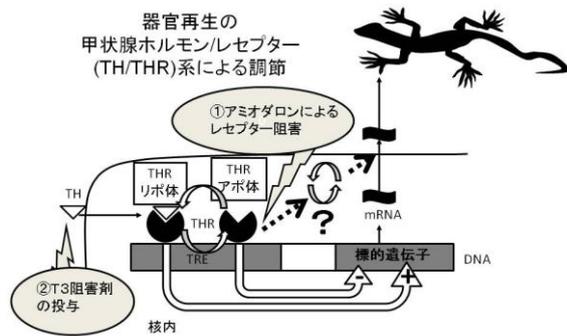
## 3. 研究の方法

### (1) アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の顎顔面損傷モデルと再生過程について

Ferratti P らの報告に基づき (Ferratti P and Chosh S., Developmental Dynamics 1997, 210, 288-304) アカハライモリの下顎もしくは上顎の半側を切除し、顎の再生初期～完成までの種々のステージで顎顔面部の組織標本作製し HE 染色下で顕鏡し歯胚再生にいたる詳細な組織学的観察を行った。再生過程を観察する期間はこれまでの予備実験から3日、3週、3か月目とした。サンプリングした再生中の顎顔面部は液体窒素を用いて急速凍結して保存し、一部は組織切片作成用コンパウンドに包埋し-80℃で保管した。両生類でも歯の発生はヒトやマウスの蕾状期、帽状期、鐘状期に相当するエナメル形成期、象牙質形成期、石灰化期の3つのステージが存在することが報告されている (Kogaya Y., J Anat. 1999, 195, 455-465)。さらにイモリの歯胚は多歯性であり常に複数の代生歯が歯槽骨内に発育段階に沿って深部から表層部に存在しておりエナメル形成期、象牙質形成期、石灰化期の3つのステージが同時に存在するという特徴がある。作成した試料はマイクロトームで薄切し HE 染色、TRAP 染色、ALP 染色 (河原元「硬組織標本作製法」; 検査と技術, 2001, 参考) にて形態を詳細に観察し上記の歯胚の形成が再生した顎骨でどのように変化しているかを確認した。

### (2) アカハライモリを用いた甲状腺ホルモン阻害剤投与実験

甲状腺ホルモン阻害剤投与実験実験群を甲状腺ホルモン素材剤投与群と無投与群に分ける。甲状腺ホルモン阻害剤プロピルチオウラシルを1) 0.04% (0.045 ~ 0.050mg/kg); 2) 0.01% (0.01 mg/kg) となるよう飼育水に混じり3週間摂取した投与群、無投与群を設定しそれぞれ治癒途中のイモリを3日、3週、3か月目に各4例の顎顔面部分をサンプリングする。THの血中濃度差や甲状腺ホルモン阻害剤投与下による甲状腺ホルモン受容体アンタゴニストの動態について顕顕所見、遺伝子の転写と翻訳レベルから検討した。



#### 4. 研究成果

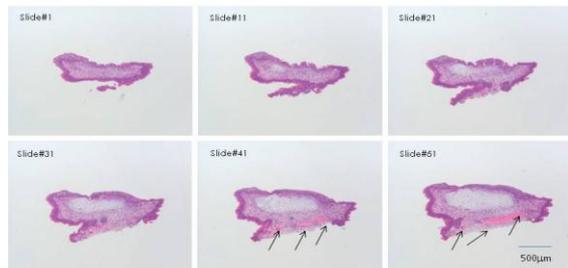
##### (1) THR のクローニングと in-situ ハイブリダイゼーション法

THR のクローニングから得られた mRNA の配列からプローブを設計し in-situ ハイブリダイゼーション法にて歯胚形成における上皮陥凹からエナメル質形成までの全ての過程で甲状腺ホルモンレセプターの mRNA レベルでの発現を確認した。また同時に抗 THR 抗体を用いて同様の部位で免疫組織染色を行い発現の時期と局在性を検討した。その結果 THR は象牙前質形成と石灰化開始期において象牙芽細胞の歯冠側で強い発現が見られることが確認された。今回の結果から発現動態を観察することで歯胚再生に関与する細胞群のネットワークを構築し歯胚原器の誘導と再生までの機構に THR が何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

##### (2) 甲状腺ホルモン阻害剤プロピルチオウラシル (PTU) 投与下での下顎骨切断後の歯槽骨の再生

甲状腺ホルモン阻害剤プロピルチオウラシル (PTU) 投与下での下顎骨切断後の歯槽骨の再生状況を観察し、PTU 投与の影響を in-situ ハイブリダイゼーション法、免疫染色法を用いて検討した。日本産アカハライモリを PTU 投与下で 1 カ月飼育したものを PTU 処理イモリとした。通常どおり飼育したものはコントロールとした。下顎骨右側歯槽骨を切断し、切断前と同条件で 50 日間飼育した後、下顎骨を採取し固定・脱灰後にパラフィン切片を作製し組織学的に顎骨再生の過程を観察した。下顎骨の切断部位は切断部では外側皮質骨から内部にかけ下顎骨が再生していた (Fig. 1)。PTU 処理イモリでは再生過程が阻害されており軟骨の形成がみられた (Fig. 2)。今回の PTU 処理イモリは再生能が一部阻害されており再生阻害モデルとして有用である可能性が示された。本年度の研究で、TH/THR 系が歯胚誘導のみならず顎骨の再生や軟骨形成にも関与している可能性が示された。

Fig.1



The regeneration of alveolar bone following 50 days after the amputation in PTU treated group. Arrows show the regenerated area of alveolar bone.

Fig.2



The regeneration of alveolar bone following 50 days after amputation in normal group. Arrows show the regenerated area of alveolar bone.

## 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4件)

①三輪 容子, 春原 正隆, 佐藤 巖: 甲状腺ホルモン阻害剤が両生類顎骨の再生過程に及ぼす影響について. 第118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 p168, 2013.

②Miwa Y, Sunohara M, Sato I: Effects of the propylthiouracil on the regeneration of alveolar bone, 91st General Session & Exhibition of the IADR, Seattle Wash., USA PROGRAM BOOK: 133, #1488, 2013.

③三輪 容子, 山口泰平, 島田 和幸, 佐藤 巖: 両生類下顎骨における甲状腺ホルモンレセプターの発現について. 第54回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会 プログラム集 p48, 2012

④Miwa Y, Shimada K, Sato I: Expression of thyroid hormone receptor in tooth germ of newt (*Cynops pyrrhogaster*), 2012 Experimental Biology, San Diego, PROGRAM BOOK, 219: 2012.

[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] なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

三輪容子 (MIWA YOKO)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号: 80409218