

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792272

研究課題名(和文) マウス歯胚形成におけるCCNファミリーの包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of CCN family upon mice tooth morphogenesis

研究代表者

長谷川 正和 (Hasegawa, Masakazu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40625042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：胎生11.5日及び、13.5日のマウス上下顎骨から採取した歯胚を10%FBS, 100mg/ml ascorbic acid, 2mM L-glutamine, 添加器官培養系で、リコンビナントCCN1, 2, 3, 4, 5及び6タンパクを培地に添加して培養した組織をX線 μ CTを用いて評価するため、まずワイルドタイプマウス歯胚を等方VOXELで撮影し、3D Tri-Bonで3次元構築した後、体積、最大歯冠長など歯冠の形態計測、及びCT値を骨塩量ファントムにより規格化し、石灰化による硬組織形成度の評価を行った。

研究成果の概要(英文)：For analysis of CCN family effect upon mice tooth morphogenesis, we cultured murine tooth germ obtained from upper and lower jaw of embryonic day 11.5 and 13.5 mice in organ culture system contained 10% FBS, 100mg/ml ascorbic acid, and 2mM L-glutamine, supplemented with recombinant CCN1, 2, 3, 4, 5, and 6, respectively. For three dimensional analysis of these organ tissue, we preliminary acquired the CT data of tooth germ of wild type mice and evaluated volume, maximum tooth length and degree of ossification.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：再生歯学・8406

キーワード：CCN μ CT

1. 研究開始当初の背景

CCN ファミリーは様々な組織に発現し、多様な役割を担っている事が明らかになっており、このCCN タンパク質の多機能性は、CCN は細胞外リガンドと受容体のシグナル伝達を統合する多分子複合体に内包されるアダプター分子であるという指摘と一致していた。すなわち、CCN タンパク質の役割をそのモジュラードメインにより構成される立体構造と比較して予測する事は、CCN タンパク質群の多機能性に関して、重要な知見をもたらす可能性があった。

歯胚形成時において、CCN2 は上皮組織、間葉組織双方に発現しエナメル芽細胞及び象牙芽細胞の分化増殖を制御しており、歯胚の形成への関与を示す報告がされた(Shimo et al, Dev Dyn, 2002, 2004,)。2008年、Pacheoらが形態形成時のマウス歯胚においてTGF- β /smad2 シグナル伝達経路、及びCCN2が発現している一方、TGF- β /smad2 シグナル伝達経路がCCN2の存在に非依存的である事を報告し、歯胚形成時における他のCCNファミリーメンバーの機能の包括的な解析の必要性を示唆した(Pacheo et al, Cells Tissues Organs, 2008)。しかし、これまでのところ、CCNファミリーが歯の形態形成において担う役割については殆ど明らかにされていなかった。

以上の背景のもと、申請者らはCCNファミリーが歯胚の形成に関与している重要な因子である事を推論した。そして、歯胚形成段階におけるCCNファミリータンパク質及び遺伝子の発現と機能の解析を行い、またCCNファミリーの一般的構成要素である4つのモジュラードメインの個別の機能解析を行う事によって、それぞれの歯の形態形成時の役割が明らかにする事を着想するに至った。

2. 研究の目的

歯の発生は多数の遺伝子、及びその産物が空間的・時間的に順序だてて連鎖的に作用して生じる、上皮間葉相互作用の産物である。CCNファミリーは6つのメンバーからなる構造的に類似した細胞外タンパク質群であり、細胞分化、遊走、増殖及び接着といった非常に多くの生物学的プロセスを制御している。CCNファミリーの内、CCN2は歯の発生に関与していると考えられているが、その他のメンバーの歯胚の発生に関する役割はまだ明らかにされていない。本研究では、マウスの歯胚形成段階におけるCCNタンパク質及び遺伝子の発現の解析を行い、またCCNファミリーの一般的構成要素である4つのモジュラードメインの個別の機能解析によって、それぞれの担う役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

歯胚におけるCCNファミリーの経時的、空間的発現パターン、及び機能を系統的に解析するため、本研究課題では以下の *in vivo* 及び *in vitro* 実験を行った。

- (1) 胎生期野生型マウスの歯形成過程におけるCCNファミリー遺伝子発現の解析
- (2) リコンビナントCCNが歯胚に及ぼす影響の形態学的解析
- (3) リコンビナントCCNが歯胚におけるRNA及びタンパク質発現に及ぼす影響の解析
- (4) 器官培養系マウス顎骨におけるマウスCCN機能亢進、機能抑制実験
- (5) CCNノックアウトマウスの歯胚発生における歯の発生に関する因子の発現解析
- (6) CCNタンパク質の各モジュラードメインが歯胚に与える影響の解析

平成24年度

(1) 胎生期野生型マウスの歯の発生過程におけるCCNファミリー遺伝子発現の解析

CCNファミリー遺伝子の発現を解析するため、野生型マウス胎仔から、胎生9.5日、11.5日、13.5日、及び18.5日の歯胚を含む上下顎組織を採取し、パラフィン包埋した後、組織切片を作製する。組織切片上でのCCNファミリーのmRNA発現パターンを検討するために、ジゴキシジェニンでラベルしたプローブを準備し、*in situ* ハイブリダイゼーション法を行う(Nonomura et al, J Anat, 2010)。CCNファミリーのmRNAの発現が微弱で、ジゴキシジェニンによる検出が難しい場合、より検出感度が高いラジオアイソトープでラベルしたプローブを用いる。申請者らの所属するグループの過去の報告により、歯胚における遺伝子発現の *in situ* ハイブリダイゼーションによる至適な解析条件はすでに確立されている(Nonomura et al, J Anat, 2010)。

(2) リコンビナントCCNが歯胚発生に及ぼす影響の形態学的解析

胎生11.5日及び13.5日のマウス上下顎骨から採取した歯胚 10% FBS, 100mg/ml ascorbic acid, 2mM L-glutamine, を添加したDulbecco's modified eagle medium培地を用いた器官培養系(Nakao et al, Nat Methods, 2011)で、リコンビナントCCN1, 2, 3, 4, 5及び6タンパクを培地に添加して培養する。組織は、X線 μ CTを用いて、50 μ mの等方Voxelで撮影し、3D Tri-Bonで3次元

構築した後、体積、最大歯冠長など歯冠の形態計測、及び CT 値を骨塩量ファントムにより規格化し、石灰化による硬組織形成度の評価を行う。

その後、パラフィン切片を作製し、H-E 染色による組織学的解析及び、von Kossa 染色により硬組織を視覚化しリコンビナント CCN が歯胚の硬組織沈着に及ぼす影響の解析を行う。(Torres-Quintana MA, et al, Arch Oral Biol, 1998)

(3). リコンビナント CCN が歯胚における RNA 及びタンパク質発現に及ぼす影響の解析
2と同様に、器官培養系マウス歯胚においてリコンビナント CCN を作用させ、歯関連転写因子である Pitx2、Msx2、Runx2、Fgf2/3、及び象牙質の分化マーカーである Dentin Matrix acidic Protein 1(DMP 1)、dentin sialophosphoprotein(DSPP)、エナメル芽細胞のマーカーである amelogenin、また matrix extracellular phosphoglycoprotein(MEPE)、及び VEGF 等の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学染色により解析する。

平成 25 年度

(4). 器官培養系マウス顎骨におけるマウス CCN 機能亢進、機能抑制実験

胎生 9.5 日マウスの cDNA を鋳型としてマウス CCN ファミリーのコード配列を PCR により増幅する。得られたフラグメントで作製した CCN 発現ベクターを器官培養系胎生 10.5 日マウス顎骨に遺伝子導入を行い、CCN 機能亢進顎骨を作製する(Terao et al, Dev Biol, 2011)。また RNA 阻害法を用いて、siRNA による CCN の機能抑制を行う。各 CCN 特異的に合成された siRNA オリゴヌクレオチドを器官培養系マウス顎骨に遺伝子導入し(Matsumura et al, Biochem Biophys Res Commun, 2011)、CCN 機能抑制顎骨を作製する。その後、Pitx2、Msx2、Runx2、Fgf2/3、DMP 1、DSPP、MEPE、VEGF 等の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学染色により解析する。器官培養系への遺伝子導入は申請者らの所属するグループが過去に報告しており、良好に機能する事が明らかである(図 1)。

(5). CCN ノックアウトマウスの歯胚発生における歯の発生に関する因子の発現の解析

CCN ノックアウトマウス(Mo et al, Mol Cell Biol, 2002, Inkovic et al, Dev, 2004, Perbal B, 2007, Kutz W, et al., 2005)の

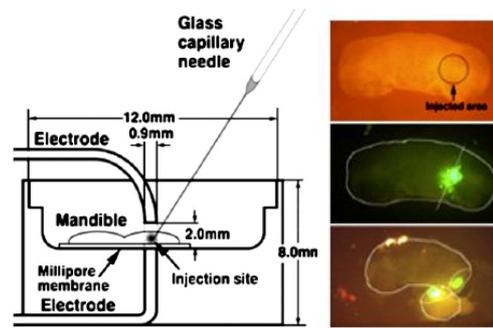


図 1 器官培養系マウス顎骨への遺伝子導入 (Terao et al., Dev Biol, 2011)

胎生 11.5 日、13.5 日の歯胚を含む上下組織の供与を受け、組織切片を作製する。歯形成過程における歯関連転写因子および分化マーカーの発現、および他の CCN ファミリーメンバーの発現を *in situ* ハイブリダイゼーション、免疫組織化学的染色により解析する。

(6). 精製した CCN タンパクの各モジュールドメイン断片の上皮細胞、間葉細胞に与える影響

胎生 9.5 日マウス臼歯歯胚を 50U/ml dispase と、35U/ml Deoxyribonuclease で酵素処理を行った後、上皮組織と間葉組織を分離する。上皮組織は 100U/ml Collagenase と 35U/ml DNase を含む PBS で酵素処理を行い、その後 0.25% Trypsin で酵素処理を行い、歯原性間葉細胞は 0.25% Trypsin、50U/ml Collagenase と 35U/ml DNase で酵素処理を行い単一化細胞とする。各ドメイン断片は PCR で調整した CCN タンパク質各ドメイン cDNA を鋳型として作成した発現プラスミドにより形質転換した *Brevibacillus chosinensis* を用いて(Kubota et al, Biochimie, 2006)産生する。各単一化細胞に CCN モジュールドメイン断片を作用させ、歯関連転写因子と分化マーカーを解析する。

(7). 成果の発表

得られた結果を論文にまとめて、国際的雑誌に投稿するとともに、国内外での発表を行う。

4. 研究成果

CCN ファミリー遺伝子の発現を解析するため、野生型マウス胎仔から、胎生 9.5 日、11.5 日、13.5 日、及び 18.5 日の歯胚を含む上下顎組織を採取し、パラフィン包埋した後、組織切片を作製し、組織切片上での CCN ファミリーの mRNA 発現パターン検討用の *in situ* ハイブリダイゼーション法を行うため、ジゴキシジェニンでラベルしたプローブを作成中である。

各 CCN モジュラー断片の影響を調べるため、胎生 9.5 日のマウス臼歯歯胚から間葉組織と上皮組織の分離を行う方法を確立した。現在たんぱく質 PCR で調整した各ドメイン cDNA を鋳型として作成した発現プラスミドにより歯関連転写因子と分子マーカーの解析を行っている。

また、胎生 11.5 日及び、13.5 日のマウス上下顎骨から採取した歯胚 10% FBS, 100mg/ml ascorbic acid, 2mM L-glutamine, を添加した Dulbecco's modified eagle medium 培地を用いた器官培養系(Nakao et al, Nat Methods, 2011)で、リコンビナント CCN1, 2, 3, 4, 5 及び 6 タンパクを培地に添加して培養した組織を X 線 μ CT を用いて評価するため、まずワイルドタイプマウス歯胚を等方 VOXEL で撮影し、3D Tri-Bon で 3 次元構築した後、体積、最大歯冠長など歯冠の形態計測、及び CT 値を骨塩量ファントムにより規格化し、石灰化による硬組織形成度の評価を行った。

ワイルドタイプマウスの歯胚の石灰化の評価については、過去に再構成歯胚とともに Oshima, Mizuno らが行っており、手法が確立している(Oshima M, Mizuno M, 2011)。将来的に、リコンビナント CCN タンパク添加群についても定量的評価を行い、CCN ファミリーの影響を明らかにしていく予定である。

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 3 件)

Takeshita N, Ishida M, Watanabe H, Hashimoto T, Daimaruya T, Hasegawa M, Takano-Yamamoto T., Improvement of asymmetric stomatognathic functions, unilateral crossbite, and facial esthetics in a patient with skeletal Class III malocclusion and mandibular asymmetry, treated with orthognathic surgery., American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 査読有, 144, 2013, 230, doi: 10.1016/j.ajodo.2012.09.024.

Kiyama T, Okada S, Tanaka Y, Kim S, Bando K, Hasegawa M, Yamaguchi K, Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y., Inflammatory and necrotic effects of minodronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, in mice. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 査読有, 230, 2013, doi: 10.1620/tjem.230.141

Watanabe H, Deguchi T, Hasegawa M, Ito M, Kim S, Takano-Yamamoto T., Orthodontic miniscrew failure rate and root proximity, insertion angle, bone contact length, and bone density.

Orthodontic Craniofacial research, 査読有, 16, 2013, doi: 10.1111/ocr.12003.

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 正和 (HASEGAWA, MASAKAZU)

研究者番号: 40625042

東北大学・大学病院・助教