

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463067

研究課題名(和文) 歯胚発生機序解明の新展開-歯堤の動態からの研究

研究課題名(英文) a study of early stage of dental formation by a novel organ culture system

研究代表者

松村 達志 (MATSUMURA, TATSUSHI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：70432648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯堤の動態を検証する事は歯胚発生初期を検証する事であり、この検証は再生歯胚ソース、再生期間の短縮、安全性などに寄与するのみならず、過剰歯、歯牙腫、歯原性腫瘍などの発生メカニズム解明にも寄与すると考えられる。

しかし、歯堤の動態を検証する実験系が確立されていないため、これまで多くの知見は得られていない。そのため、本課題では歯堤の動態検証の実験系の確立に着手した。その結果、培養試料採取時期の決定と大量培養法を確立し、更に培養下で起こる分化を遺伝子レベルで解析出来る様になった。

研究成果の概要(英文)：The analysis of dental lamina helps to clear the early stage of dental formation. That analysis contributes to not only establishment of the artificial tooth germ (e.g.; cell source, culture period and safety), but also clarification of the etiology of supernumerary tooth, odontoma and odontogenic tumors.

But the behavior of the dental lamina remains largely unclear due to the difficulty to mimic the procedure. Thus it is extensively necessary to establish the experimental model for the early stage of dental formation. To understand the variety of events of dental lamina during early stage of dental formation, further investigation is needed and our organ culture is essential to develop the experimental model.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 歯堤 再生医学

1. 研究開始当初の背景

今日、再生医療が脚光を浴びており、骨・粘膜など単一細胞による再生医療は一部実用化されつつある。しかし、複合組織かつ立体構造をもつ器官の再生までには至っていない。多くの器官と同様に上皮・間葉相互作用で発生する歯は、他の器官と比べてサイズが小さい事、血流や周囲の組織に殆ど依存しない事、動物実験を行なう場合に歯の欠損によって動物が死に至らない事などから、器官発生や再生研究の上で優れたモデル器官・実験系といえる。このことは、我々歯科領域の研究者のみならず、器官の発生や再生に携わる研究者にとっても広く認知されており、その発生機構の解明は広く求められている。

これまで、歯の発生研究は歯冠形成期の上皮・間葉相互作用を中心に進められてきた (Thesleff et al, J Cell Sci 2003 など)。申請者らも細胞培養や歯胚の器官培養を用いて、分化誘導シグナルの肝細胞増殖因子 (HGF) や骨形成タンパク (BMP) 4 などの関与を明らかにしてきた (Matsumura, Tabata et al, Int J Dev Biol 1998; Tabata, Matsumura et al, Development 1996; Tabata, Matsumura et al, J Histochem Cytochem 2003; Liu, Tabata, Matsumura et al, Eur J Oral Sci 1998)。また、器官培養等を用いて歯根形成期についても、IGF-1 や骨芽細胞分化に必須の転写調節因子 Runx2 などの関与を明らかにしてきた (Fujiwara, Tabata et al, Cell Tissue Res 2005; Hirata et al, J Histochem Cytochem, 2009.)。しかし、歯胚培養では見事な歯冠が形成されるにもかかわらず、細胞培養では基質形成や細胞形態が貧弱でその落差が大きかった。そこで、2007年より申請者らは上皮と間葉の細胞を個々に調整し、個々に制御できる共培養法 = TDL 培養を開発し、エナメル芽細胞の典型的な形態と歯胚組織の再構築を可能にしてきた。

一方、他のグループは異なったアプローチ

で再生歯胚をつくり (Tsuji et al, Nature Methods 2007)、そこから歯胚再生の新たな可能性が示されるようになってきた。しかし、再生歯胚を作る細胞をどこから得るか、培養期間をどこまで短縮できるか、歯冠や歯根の形態制御をどこまでできるか、など未だ課題が多い。しかし、近年の研究では、歯堤において幹細胞の存在が示されており (Juuri et al, Dev Cell 2012)、歯堤伸長が続く多生歯性動物では、幹細胞マーカーのひとつ Sox2 の発現も続くことから (Richman & Handrigan, Genesis 2011)、歯堤が伸長する歯胚発生初期を解明する事は再生歯胚作製に関する諸問題を解決出来る可能性を秘めている。そこで、前述の歯胚の器官培養法を歯胚発生初期の in vitro 実験系に応用して、歯胚発生初期のメカニズム解明に切り込むことを着想した。

2. 研究の目的

申請者らは、このプロジェクトを以前に、下顎骨器官培養 (Fujiwara, Tabata et al, Cell Tissue Res 2005) を導入した歯根形成期の機能的解析を試みてきた。そこで、これまで行ってきた歯胚の器官培養法を歯胚発生初期の in vitro 実験系に応用して新たな器官培養法の確立と新たな実験系による歯胚発生初期での各因子の機能的解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料の検定

下顎臼歯の採取

胎生 10-16 日齢 (E10-16) マウスより下顎骨を摘出し、氷温の Hanks へ浸漬した。摘出された下顎骨を実体顕微鏡下で周囲硬軟組織を除去しながら下顎臼歯を摘出して試料とした。

(2) 観察方法

固定・脱灰

10% パラフォルムアルデヒドで常温下、

または4% パラフォルムアルデヒドで4下、3日間浸漬固定した。脱灰まで期間がある場合には、0.05M Phosphate Buffer pH7.4 に浸漬して4 保存した。脱灰は5% EDTA または 10% ギ酸で行った。

切片作成

通法通り、脱灰後、パラフィン包埋を行い、ミクロトームを用いて厚さ6 μ m に薄切した。

凍結非脱灰切片の作成は、サンプルをTCA コンパウンドに埋没・凍結し、包埋後、川本法で薄切、または、クリアレジジン樹脂(テクノビット)包埋後、薄切した。

染色

形態観察では、通法通り、Hematoxyline-Eosin 染色(HE 染色)を行った。

(3) 臼歯歯胚器官培養

胎生期のマウス胎仔の下顎臼歯を実体顕微鏡下で摘出した。

抗生物質入りのHanks BSS などで洗浄して、試料を無菌化した。

ニトロセルロース紙に向きを考えながら試料を配置した。

二重シャーレ、もしくは通常シャーレにステンレスメッシュの台を設置し、この上に歯胚を配置したニトロセルロースを置いた。

培地はBGJb を使い、液量は歯胚がちょうど界面になる高さまで満たして、100%湿度、5% CO₂ 37 のインキュベータで培養した。

培地は翌日から2日に一度、交換した。

(4) プライマーの作成

発現パターンなどから、歯胚に特異的に発現する遺伝子のリストを作成した。

Entrez で目的遺伝子の配列を取得した。

Blastn で配列のホモロジー検索を行い、配列の中でどこがホモロジーが低いかを把握した。

Primer3 plus でホモロジーの低いところをねらったプライマーを作成した。プライマー長は20base、プロダクトは500base以上になるように設計した。

北海道システムサイエンスにプライマー合成を発注した。

(5) プライマー検定

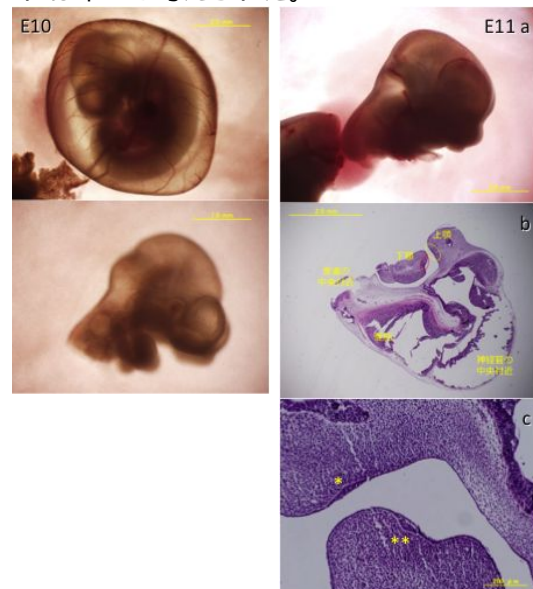
合成したプライマーが到着後、歯胚などから抽出したRNA を元に作成した cDNA をテンプレートとして、PCR を行った。

PCR のプロダクトをアガロースゲル電気泳動にて確認した。シングルバンドがしっかり出ていれば、プライマーがうまく出来ていることを意味する。複数バンドが出現した場合には、もう一度、設計からやりなおした。

4 . 研究成果

(1) 器官培養の試料採取時期の検討

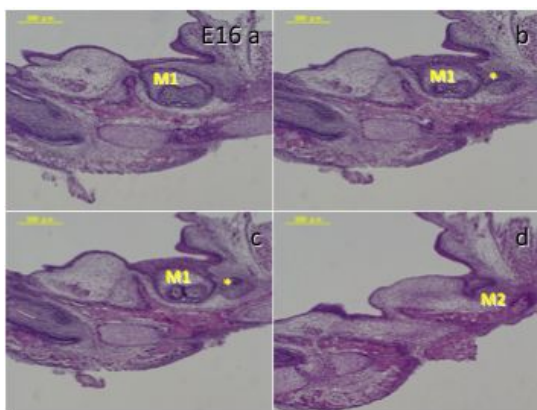
E10, 11, 16 マウスの下顎臼歯を検討した。E10 では、サイズが小さく(下図 E10) 臼歯歯胚の形成を認めなかった。E11 では上下顎に歯胚初期を示す粘膜の肥厚(E11c; *上顎、**下顎)を認めたが、歯堤の観察および培養には早いと考えられた。



E16 では、第一臼歯(M1)、第二臼歯(M2)を認めた(連続切片 E16a-d)。M1 がまず現れ、やがて M2 が見え、M1 の後端と M2 の前端が

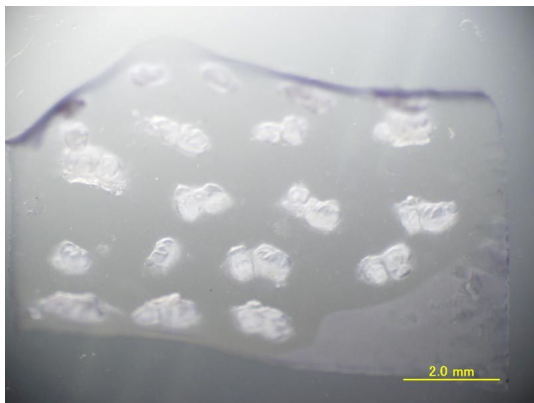
連結する様にして発生していた。一瞬、M1の上にはひろく粘膜上皮と癒合している部分(*)が現れ、これは、薄い葉状構造(歯堤)と考えられた。そして、M2の上部が粘膜上皮と歯堤でつながっているような像となっていた。

つまり、この葉状乳頭の前端と後端が大きくなっていてかつ弯曲している様であり、あたかも乳歯と永久歯をつなぐ歯堤のような構造がM1とM2の間に再現されていた。



(2) 大量器官培養

前記試料を用いた培養を従来通りに行っていた所、サンプル数の問題が生じたため、従来のニトロセルロースを大きくし、試料の配置を工夫することで大量培養することが可能となった。なお、試料採取は歯胚発生時期および試料サイズからE14が適正と判断した。

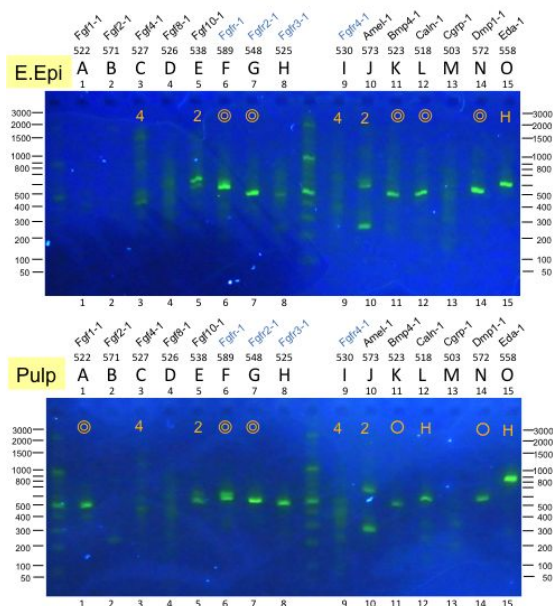


(3) 遺伝子プライマーの作成

歯胚発生に機能している遺伝子を検出できるように、それぞれのRNA配列をEmblやNIHから得て、PCR用のプライマー(フォワード鎖とリバース鎖)を設計した。

ード鎖とリバース鎖)を設計した。

プライマーを作成する時は、フォワードとリバースに挟まれる長さ(=プロダクト長に相当)を500bp以上にして、将来、in situ用プローブ作成にも使えるようにした。テンプレートとしては、ラットおよびマウスの歯胚から抽出したRNAをcDNA化したものを用いた。また、歯胚をさらに上皮と間葉に分けたもの、エナメル芽細胞や象牙芽細胞由来の株細胞なども用いて、個々のプライマーに合わせたテンプレートを使って、その品質のチェックをした。PCR後、プロダクトをアガロースゲル電気泳動した例を図に示す。



こうした作業の結果、現在、使用できる品質のプライマーとして、Amelogenin、Calretinin (Calbindin 2)、CGRP (CALCA)、DMP-1、EGF、Enamelin、FGF1,2,4、HGF、Keratin 14、MMP-20(Enamelysin)、p21、Runx2等、マウスで、40種以上、ラットで40種以上、作製した。これらを使って、培養下で起こる分化を遺伝子レベルで解析できるようになった。

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 2件)

Kita K, Yamachika E, Matsubara M,

Tsujigiwa H, Ishida N, Moritani N, Matsumura T, Mizutani M, Fujita Y, Takabatake K, Ejima K, Nagatsuka H, Yamaguchi Y, Iida S, Anti-osteoporosis effects of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid in ovariectomized mice with increasing of bone density., Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有, 28(1), 66-72, 2016, doi:10.1016

Yamachika E, Matsubara M, Ikeda A, Matsumura T, Moritani N and Iida S, Treatment of osteonecrosis of jaw., Journal of craniofacial surgery, 査読有, 26(7), e575-577, 2015, doi: 10.1097/SCS.0000000000002127

〔学会発表〕(計 2 件)

Y Goda, T Matsumura, Y Yanagi, N Moritani, M Matsubara, N Ishida, Y Matsui, N Kishimoto, S Iida, A safety reference point for IVRO in mandibular Morphology, The 10th Asian Congress of Oral and Maxillo Facial Radiology (ACOMFR), November 20-22, 2014, Bali-Indonesia.

N Moritani, T Matsumura, E Yamachika, Y Goda, A Uemura, N Nakata, S Tamura, Y Yoshioka, S Iida, A Novel Guide Device of the Osteotomy Line for Intraoral Vertical Ramus Osteotomy., The 22nd International Conference on Oral & Maxillofacial Surgery (ICOMS), October 27-30, 2015, Melbourne-Australia.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松村 達志 (MATSUMURA TATSUSHI)
岡山大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・
講師
研究者番号: 70432648

(2)研究分担者

田畑 純 (TABATA JUN)
東京医科歯科大学・大学院医歯(薬)学総
合研究科・准教授
研究者番号: 20243248

平田 あずみ (HIRATA AZUMI)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40263587

山近 英樹 (YAMACHIKA EIKI)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号: 10294422

森谷 徳文 (MORITANI NORIFUMI)
岡山大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・
助教
研究者番号: 60467751

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし