

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592298

研究課題名（和文） アフリカツメガエル胚未分化細胞からの試験管内での歯牙及び顎骨を含む顎顔面領域誘導

研究課題名（英文） Induction of tooth and craniofacial tissue from undifferentiated *Xenopus* ectoderm *in vitro*

研究代表者

福井 康人 (FUKUI YASUTO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90363085

研究成果の概要：

アクチビンAを用いたアニマルキャップサンドイッチ培養法で作成した explant に歯牙様構造が誘導されたか否かを検討したところ、培養期間30日では誘導されていなかった。また、同 explant を正常胚腹部に移植し、成体まで飼育した後、移植組織を組織学的に検討したところ、移植組織内に歯牙様構造を認め、アメロジェニン抗体による免疫染色でも陽性反応を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：アニマルキャップ、歯牙誘導、顎骨

## 1. 研究開始当初の背景

1980年代半ばからFGFやTGF- $\beta$ など、中胚葉誘導能を有する幾つかの分子が同定されてきた。(Tiedemann Zool Sci 7:171-186, 1990 Asashima Dev Growth Differ 36:343-355, 1994) なかでもTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属すアクチビンAは、両生類の胚の予定外胚葉に相当するアニマルキャップを用いるアニマルキャップアッセイにより強力な中胚葉誘導能を持つことが報告されてきた。アクチビンAの中胚葉誘導活性は濃度依存的で、低濃度では血球、体腔上皮、間充織が、中濃度では筋肉、高濃度では最も背側の中胚葉であ

る脊索が誘導される。(Ariizumi, et al. Rou's Arch. Dev. Biol. 200:230-233, 1991) またアニマルキャップを一定時間アクチビンAで処理し、異なった時間前培養した後に再び別の未処理アニマルキャップ二枚で挟むサンドイッチ培養系では、前培養時間に依存して胴尾部から頭部までの組織が誘導される。(Ariizumi, et al. Dev. Growth Differ. 36:499-507, 1994) さらに現在までに両生類胚アニマルキャップとアクチビンAを用いて *in vitro* で種々の臓器や器官を誘導できることが明らかとなってきた。(Okabayashi, et al. Curr Opin Genet Dev. 13:5

02-7, 2003) 我々はすでに、アフリカツメガエル幼生の下顎部の軟骨を限局的に形成することができることを報告しており、この事実は、部位特異的に臓器、器官を誘導できることを示唆している。(Furue. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 99:15474-15479, 2002.)

一方、アフリカツメガエルは発生過程が早く、受精後4日で殆どの器官が形成され、現在報告されているアニマルキャップアッセイの培養期間は3-4日である。しかしながら、歯牙形成は、アフリカツメガエル幼生において、その器官形成時期が発生の後期に当たるため、アニマルキャップアッセイにおいても誘導に従来以上の培養期間が必要であり、一般的にアニマルキャップアッセイに使用されている培養液(Steinberg氏緩衝液;カエルの生理食塩水)では器官誘導が困難と予想されたため、我々は長期培養に適した培養液の開発し、その実用に至った。(Y. Fukui, et al. Dev. Growth Differ. 45:499-506, 2003)

## 2. 研究の目的

アニマルキャップサインドイッチ培養系を用いて *in vitro*での歯牙を含む口腔領域の部域誘導を試み、その誘導に関与する遺伝子、分子群を明らかにし、再生医療への応用の可能性を探る。さらに、アニマルキャップサインドイッチ培養において誘導された組織片は容易にアフリカツメガエル幼生への移植手術が可能であることより、誘導された組織片が生理的な機能を果たし、幼生の成長とともに成熟した器官として機能を果たすか否かの検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) アニマルキャップサインドイッチ培養

雌雄アフリカツメガエルに性腺刺激ホルモンを注射し、人工授精させ、受精卵を得る。実体顕微鏡下、アニマルキャップ(explant)を切り出し、アニマルキャップサインドイッチ培養を行う。培養の条件は、我々(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 99:15474-15479, 2002.)が確立した、アクチビンAを100ng/mlを含むSteinberg氏緩衝液中での1時間処理後、アクチビンAを含まないSteinberg氏緩衝液で1時間前培養。その後、未処理アニマルキャップ2枚で挟み込むという条件で行い、explantの培養は、我々が長期培養用に開発したRDX培地を用いて30日間培養を行う。また、培養期間が終了したexplantは組織固定後、アルシアンブルー・PAS染色を行

い、explant内に誘導された組織を顕微鏡下で組織学的に検討する。さらに、歯牙特有タンパクとして広く知られているアメロジェニンに対する抗体を用いて免疫染色を行い、explant内に歯牙誘導がなされたか否かを検討する。

### (2) PCRによるアメロジェニンの発現の検討

各ステージの正常胚およびサインドイッチ培養、0, 1, 2, 4, 10, 14日目のexplantより抽出したRNAを用いて *Xenopus* Amelogenin 遺伝子の発現をRT-PCR法を用いて検討を行う。

### (3) explantの移植

正常胚(St. 23)の腹部にサインドイッチ培養にて作成したexplantを移植後、成体(St66)になるまで飼育をつづけ、固定後、EDTAによる脱灰を2日間行い、通法に従ってパラフィン切片を作成した。その後PAS-アルシアンブルー・PAS染色を行い組織学的に評価した。

### (4) 免疫組織染色

(3)で歯胚様構造を含む組織誘導を確認した連続切片に対し、アメロジェニン抗体を用いて免疫染色を行い、アメロジェニンの発現の有無を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) アニマルキャップサインドイッチ培養

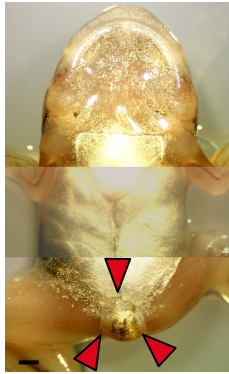
RDX培地を用いて30日間培養後、explantを固定、アルシアンブルー・PAS染色を行い、組織誘導を検討したところ、explant内に軟骨組織は誘導されていることは確認出来たが、歯胚様構造は誘導されていなかった。また、アメロジェニンによる免疫染色においてもexplant内に歯胚様構造は確認できなかった。

### (2) PCRによるアメロジェニンの発現の検討

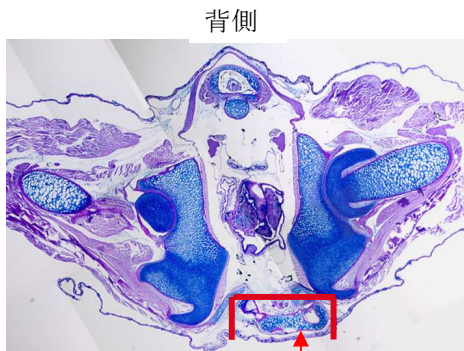
explantより抽出したRNAを用いてアメロジェニンの発現をRT-PCRにて確認したところ、培養10日目のRNAからアメロジェニンの発現が確認された。

### (3) explantの移植

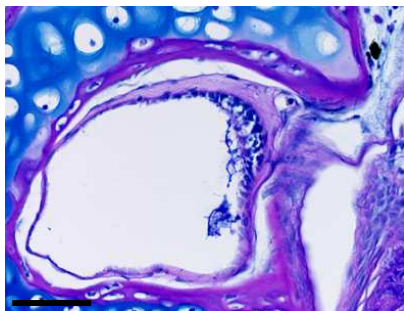
正常胚(St. 23)腹部へ移植後、飼育を続けたところ、腹部移植組織も成長に伴い肥大を認めた。移植組織は、変態開始時の両脚の出現を妨げず、変態後期には、尾部の吸収とともに縮小し、飼育50日目には、変態を完了し、成体に成育した。成体に成長したものは、運動障害など異常を認めず、両脚基部に膨隆した移植片を認めた。飼育50日目の成体を固定後、脱灰操作をへて、アルシアンブルー・PAS染色を行い、組織学的に解析したところ、移植部組織は、成熟した軟骨組織によって構成されていたが、一部分はPAS染色にて赤紫色に染まる骨組織を認めた。また、移植部組織内に歯胚様構造を認めた。



成体 (St. 66)



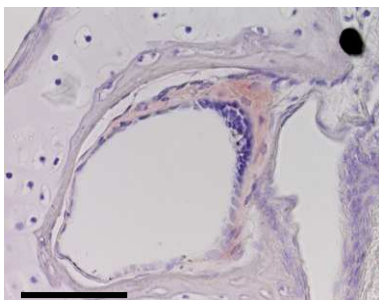
移植部



歯胚様構造

(4) 免疫組織染色

歯胚様構造を含む組織誘導を確認した連続切片に対し、アメロジェニン抗体を用いて免疫染色を行ったところ、歯胚様構造に一致してアメロジェニンの発現を認めた。



アメロジェニンの発現

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)

(1) Furue MK, Na J, Jackson JP, Okamoto T, Jones M, Baker D, Hata R, Moore HD, Sato JD, Andrew PW, Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. Proc Natl Acad Sci USA. 105(36):13409-13414, 2008 Aug, 査読有

(2) 林洋平、古江美保、明石靖史、岡本哲治、浅島誠、マウス E S 細胞の無血清培養法、組織培養研究、27 巻、107-115、2008 年 9 月、査読有

(3) Hayashi Y, Furue MK, Okamoto T, Ohnuma K, Myoishi Y, Fukuhara Y, Abe T, Sato JD, Hata R, Asashima M, Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. Stem cell, 25(12):3005-3015 2007 Aug., 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 林洋平、大沼清、岡本哲治、浅島誠、古江美保、E S 細胞における細胞外マトリクス-インテグリンシグナルの影響、組織培養学会、2008 年 5 月 19 日 茨城

(2) 鍋島巧、福井康人、明石靖史、古江美保、浅島誠、岡本哲治、アフリカツメガエルの顎顔面領域に発現する遺伝子群とその機能解析、日本口腔科学会 2008 年 4 月 17 日 福岡

(3) 木村直大、古江美保、福井康人、明石靖史、末盛博文、中辻憲夫、Andrews Peter W、岡本哲治、マウス、サルおよびヒト E S 細胞とヒト骨髄由来間葉系幹細胞の無血清培養、日本口腔科学会 2008 年 4 月 17 日 福岡

(4) 古江美保、林洋平、有木信貴、大沼清、畑隆一郎、岡本哲治、浅島誠、幹細胞研究の基礎と応用 胚性幹細胞の無血清培養条件下における神経提細胞への分化誘導、日本炎症・再生医学会、2007 年 8 月 2 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 康人 (FUKUI YASUTO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90363085

(2) 研究分担者

岡本 哲治 (OKAMOTO TETUJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00169153

虎谷 茂昭 (TORATANI SHIGEAKI)

広島大学・病院・講師

研究者番号：90172220

小林 雅史 (KOBAYASHI MASASHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教

研究者番号：30346506

(3)連携研究者