

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）  
研究期間： 2008～2009  
課題番号：20791345  
研究課題名（和文） 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  
研究課題名（英文） The molecular mechanism about the regeneration of the tooth using amphibian model.  
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）：今回の研究でアカハライモリの歯の発生/再生過程において VEGF と VEGF レセプターの特徴的な局在性が示された。VEGF はヒト、げっ歯類同様イモリの歯の発生においても内エナメル上皮や象牙芽細胞の分化に幅広く影響を与えている可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is shown that the immunohistochemical localization of VEGF and its receptor and showed the specific expression pattern of VEGF and VEGF receptor in *Cynops pyrrhogaster* tooth development. It is postulated that the expression of VEGF in the inner enamel epithelium and odontoblast widely effects tooth development in newts, as well as in human and rodents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,200,000	360,000	1,560,000

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

(1) 近年口腔のクオリティ・オブ・ライフ向上の視点から歯周病やう蝕により喪失した歯を血管や神経、歯周組織を含めて再生し口腔内で機能させる再生治療の必要性は高まってきている。臨床的には抜去した智歯等を別の抜歯窩に移植する再植法が行われているが、歯髄の神経や血管の再生は難しく又、歯根と骨の結合は歯根膜の生理的再生治療によるものではなく骨性癒着で結合することが多いため(Andreasen JO, *Int J Oral Surg.* 1981, 10, 54-61)、移植歯の寿命も数ヶ月～数年と天然歯に比べて短いのが実情である。最近マウスを用いた実験で胎児マウスより歯胚を摘出し上皮組織と間葉組織を体外で培養し再度、抜歯窩に再植する歯牙再生について報告がなされた(Nakao K et al., *Nat Methods.* 2007, 4, 227-230)が、この実験系はマウスの臼歯を用いて器官培養した歯胚を自家移植する方法で、初期の歯胚細胞自体を生体内から誘導し新たに歯を再生させる本来の再生とは著しく異なる。

(2) 歯の発生には様々な物質が上皮・間葉間で相互作用して歯胚を形成する細胞が影響を及ぼしあい歯胚が誘導される。象牙芽細胞ではDentin Sialoprotein (Ritchie HH et al *Eur J Oral Sci.* 1997, 105, 405-413)、エナメル芽細胞ではエナメルリン、アメロジェニン(Uchida T et al., *Arch Histol Cytol.* 1989, 52, 543-552)など分化にともなう特有のタンパクの発現が知られている。従来、エナメル芽細胞(上皮由来)の分化には血管内皮増殖因子であるVEGFやVEGFレセプターは存在しないと考えられていたが、最近、申請者はヒト胎児の歯胚を詳細に検索し象牙芽細胞、エナメル芽細胞の分化期に血管内皮増殖因子であるVEGFとそのレセプターVEGFR-2

が存在することを明らかにした(MIWA Y et al., *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 2007, 84, in press: *Journal of Oral Biosciences* 2005, 47, 104)。また近年VEGFは本来血管内皮細胞の増殖因子であるが、筋芽細胞や骨芽細胞、破骨細胞など様々な器官を構成する細胞にも発現していることが知られてきた(Ferrara, N et al., *Nat. Med.* 9, 2003, 669-676)。このため他の器官を構成するときに見られる血管内皮増殖因子とレセプターがどうして歯胚のエナメル芽細胞や象牙芽細胞に存在するのかという疑問が生じた。有尾両生類イモリは歯胚自体を新たに再生する能力がある特異な動物であり、下顎や上顎を切除後に、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)。しかしこの特異な再生過程に着目し血管マーカー(CD31、VEGF、VEGFR)の動態を顎形成の中でとらえた実験系は今までのところ報告されていない。このためイモリを実験系として用いて歯胚の初期から完成期までの全過程でVEGFとVEGFRの発現の局在や時期を研究することで、VEGFの口腔における歯胚や顎骨、筋などの諸器官との相互作用機構を分子生物学的レベルから解明することが出来ると考えた。また象牙芽細胞の分化マーカーであるDentin Sialoproteinやエナメル質に特有のタンパク質であるエナメルリン、アメロジェニンなど歯胚を構成する細胞に特有なマーカーとの関連性についても検討し、顎顔面と歯胚の再生におけるVEGFとVEGFRの発現の役割について、血管の新生や再生との関連性からも形態学的なレベルから解明することが可能であると考えた。

## 2. 研究の目的

ヒト歯胚では VEGF, VEGFR-2 の発現と象牙芽細胞、エナメル芽細胞の分化には関連性が見られた (MIWA Y et al., Okajimas Folia Anatomica Japonica 2007, 84, in press: Journal of Oral Biosciences 2005, 47, 104)。この経緯からイモリの歯の再生時においても血管マーカー (CD31, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2) について歯胚の再生に伴いそれぞれ特有な発現動態が明らかに出来ると考えた。また両生類の正常例で歯の発生は連続するエナメル形成期、象牙質形成期、石灰化期の 3 つのステージを経て形成される (Kogaya Y., J Anat. 1999, 195, 455-465) ことが報告されているが、再生した歯胚の分化・成熟の過程をイモリを用いることで解明することを目的とした。生体内から直接歯胚が再生するという特徴的なイモリの歯の再生機構について着目した研究は今まで類を見ず、この分子メカニズムを研究することは歯胚再生について新たな視点を与えるものである。また、この歯の再生についての研究成果は脊椎動物全体の歯牙再生機構についても新たな情報を提供するものであり、将来安全で成功率の高い生体内からの歯の再生療法の開発に応用できる情報になると確信している。

## 3. 研究の方法

イモリの組織より採取した mRNA から RT を行い cDNA を作成する。歯の萌出の関与が考えられるマーカー (VEGF, Csf1, Pthr1,) について近縁種からジェネレートプライマーを作成し相同遺伝子を得てクローニングし同定する (Lutz GJ., et al. J. Physiol. 1998, 508, 667-680)。この配列に基づき cDNA から RNA プローブを合成し、in-situ hybridization 法による組織切片中の mRNA の局在性を経時的に観察することで (Aida M et

al, J Dent Res. 2005, 84, 234-239) 歯胚再生時の各マーカーの動態を明らかにする。またこれら血管マーカーの発現について抗体を用いてのタンパクレベルでの局在性も検討する。歯胚や周囲の歯槽骨をマイクロダ イセクションで採取し、含まれる mRNA を抽出し RT-PCR 法で逆転写し cDNA を形成し各マーカーの発現量をリアルタイム PCR で定量化する。以上により顎顔面の再生、特に歯胚の再生から萌出までの一連について VEGF とその関連因子の発現を解明し顎再生時における血管マーカーの役割を検討する。

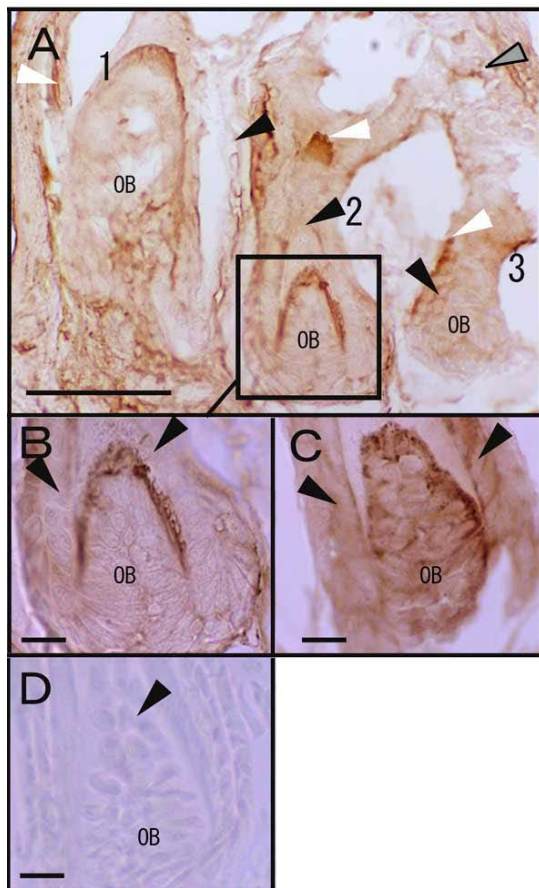
## 4. 研究成果

歯の発生・再生に関与すると考えられるマーカーのうち VEGF とレセプター VEGFR-2 の免疫組織学的染色において明らかな結果が得られたため、学会発表を行った。本研究は多歯生性のイモリを実験系として用い、成体の歯胚の VEGF と VEGFR の発現の局在や時期について研究を行った。イモリの歯胚は連続し顎骨内で発生しており、VEGF と VEGFR-2 は歯胚周囲の顎骨、筋などの諸器官の血管にも発現が見られたが、歯胚においては両者の発現が歯髄や象牙芽細胞、エナメル芽細胞 (内エナメル上皮) に局在性がみられた。VEGFR-2 は歯の発生の全過程で外エナメル上皮に発現がみられ、象牙芽細胞においては象牙質形成期において歯冠側に強い発現がみられた (Fig. 1A-B)。また VEGF の発現は外エナメル上皮が強く、内エナメル上皮には当初弱い反応であったが、発生後期のエナメル基質成熟期には逆転し内エナメル上皮の方が外エナメル上皮より反応性が強くなった。

イモリ歯胚形成において血管内皮増殖因子 VEGF が特定の時期・部位に発現していることから、VEGF の新たな働きの可能性が示唆された。これらの結果は口腔における歯胚

や顎骨、筋などの諸器官とで何らかの相互作用が存在することを示唆している。続いてイモリの顎骨について顎骨を含めた歯胚自体の再生について検討したところ、上顎は切断後4ヶ月程度でほぼ再生することを確認した。本研究助成を通じてアカハライモリの歯胚の形成に VEGF, VEGF レセプターが関与していることが考察された。近年歯周病やう蝕により喪失した歯を血管や神経、歯周組織を含めて再生し口腔内で機能させる再生治療の必要性は高まってきており、両生類の再生機構をヒトへも応用することで国民の口腔衛生の向上に貢献していきたい。

Fig. 1



A ; エナメルタンパク分泌期からエナメル基質形成期を通した VEGFR-2 抗体の反応、  
 B ; A で示した歯胚の拡大図、VEGR-2 タンパク  
 C ; B で示した部位を VEGF 抗体で免疫染色を行った図、 D ; コントロール。

bar=100um in A, bar=10um in B. 白矢頭 ; 外エナメル上皮。黒矢頭 ; 内エナメル 上皮、  
 灰矢頭 ; 周囲骨にみられる血管。OB ; 象牙芽細胞

## 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)

[学会発表] (計2 件)

① 三輪容子、山口泰平、佐藤巖 ; アカハライモリ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115回日本解剖学会総会、平成22年3月30日

② 三輪容子、佐藤巖 ; アカハライモリ歯胚における VEGF の発現について、歯科基礎医学会、平成20年9月23日

[その他]

ホームページ等

[http://www.fasebj.org/cgi/content/meeting\\_abstract/24/1\\_MeetingAbstracts/634.2?maxtoshow=&hits=20&RESULTFORMAT=&searchid=1&FIRSTINDEX=0&displaysectionid=Bones%2C+Cartilage+and+Teeth%3A+Teeth+and+Tooth+Development&volume=24&issue=1\\_MeetingAbstracts&resourcetype=HWCIT](http://www.fasebj.org/cgi/content/meeting_abstract/24/1_MeetingAbstracts/634.2?maxtoshow=&hits=20&RESULTFORMAT=&searchid=1&FIRSTINDEX=0&displaysectionid=Bones%2C+Cartilage+and+Teeth%3A+Teeth+and+Tooth+Development&volume=24&issue=1_MeetingAbstracts&resourcetype=HWCIT)

## 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