

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890161

研究課題名（和文） 再集合培養法を用いた顎顔面組織の誘導研究

研究課題名（英文） Study of craniofacial tissue induction by aggregation culture

研究代表者

鍋島 巧 (NABESHIMA KOH)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：10550999

研究成果の概要（和文）：

アフリカツメガエル胚再集合培養系において、顎顔面領域の軟骨組織を誘導するアクチビン A 処理群及び比率 1:5 の再集合体と、脊索が誘導される 1:1 の再集合体を作成し、DNA マイクロアレイ法を用い比較すると、検索した 8000 個の遺伝子の内 51 個の遺伝子が 1:5 再集合体において発現上昇を認めた。その内、神経堤形成に関与する遺伝子が 9 個含まれていた。さらに、神経堤形成に関与しない遺伝子について検討し、syntenin, tamalin がアフリカツメガエル胚頭部に発現している事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

By the Xenopus aggregation method, aggregate inducing cartilage tissues of maxillofacial region, which activin A-treated cells were mixed with untreated cells at a ratio of 1:5, and aggregate inducing notochord at a ratio of 1:1 were generated. when 1:5 and 1:1 aggregate were subjected to a microarray experiment using Xenopus DNA microarray chips representing over 8,000 unigenes, we identified 51 genes that are specifically up regulated in 1:5 aggregate. Of the 51, 9 genes have been linked to neural crest induction. Among them, we investigated any genes that haven't been involved in neural crest and revealed that syntenin and tamalin genes expressed in maxillofacial region of Xenopus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：再生医療

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：(1)アニマルキャップ (2)ES 細胞 (3)再生医療 (4)顔面組織

1. 研究開始当初の背景

発生生物学の研究には、卵が大きく操作が容易なアフリカツメガエルを利用することが多い。受精後卵割を繰り返し、胞胚期と呼ばれる段階まで発生が進むと、胚の動物極側内

部に、胞胚腔と呼ばれる空洞が形成され、その上方の細胞層がアニマルキャップ(AC)と呼ばれている部分である。この AC は未分化細胞群であり、中胚葉誘導因子として知られているアクチビン A を用いたアニマルキャ

ップアッセイにより、AC 細胞から、血球・体腔上皮・筋組織・脊索といった様々な中胚葉組織のみならず、神経組織等の外胚葉組織や腸管等の内胚葉組織を誘導できる事が報告されている(Ariizumi and Asashima, Development, growth & differentiation, 1994)。

私の所属する研究室では、顎顔面領域においては、AC と、アクチビン A を用いたサンドイッチ培養法で、顎顔面領域の位置情報を持つ軟骨組織が誘導可能である事を報告した(Furue M. et al, Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 2002), さらに、アクチビン A 処理した AC と、アクチビン A 未処理の AC を混合して再集合体と呼ばれる細胞塊を作成し、培養する再集合培養法を行うと、非常に効率良く顎顔面領域の位置情報を有する軟骨組織が誘導される事も報告している(Myoishi Y. et al, Int. J Devel. Boil., 2004)。この再集合培養系では、アクチビン A 処理群と未処理群の混合比率を変えるだけで、頭部の軟骨組織から背側の中胚葉である脊索まで、位置情報の異なった組織が誘導される。この事から、それぞれ異なった位置情報を有する再集合体を比較する事で、顎顔面組織の形態形成に関与する遺伝子群の探索や、その機能解析を行える可能性が考えられる。

一方、哺乳類の胚性幹(ES)細胞は、アニマルキャップと同様に、あらゆる細胞に分化する多分化能を有する事が明らかとなっている。1981年に初めて樹立されたマウス ES 細胞は、その未分化性と多分化能を維持するためには、従来はマウス由来線維芽などのフィーダー細胞と血清を用いて培養される必要があったが、我々はフィーダー細胞と血清を用いない無血清培養系を確立した(Furue M. et al, In vitro cellular & developmental biology. Animal. 2005)。この培地は現在ニプロ社より販売されている。ES 細胞からは、これまでに、軟骨組織はもとより、様々な組織の誘導が可能となっているが、顎顔面領域などの位置情報を有した軟骨組織を誘導したという報告はない。臨床応用するうえで、誘導された組織が、位置情報を有している事は重要であると考えている。先に述べたアフリカツメガエル胚再集合培養法は位置情報を有する組織を誘導可能であり、同培養法は技術的に哺乳類 ES 細胞にも応用可能であると考えている。

2. 研究の目的

研究期間内に、まず、アフリカツメガエル胚再集合培養系を用いて、顎顔面領域の位置情報を持つ軟骨組織を誘導する再集合体と脊索を誘導する再集合体を作成し、再集合体で発現している遺伝子群を比較検討し、顎顔面

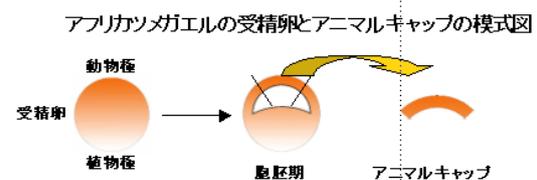
領域の形態形成に関与が示唆される未知の遺伝子群を検索する。さらに、検索した遺伝子の顎顔面領域組織形成に及ぼす機能について解析する。また、アフリカツメガエル再集合培養系を進展させ、無血清培養系で未分化性と多分化能を継代維持されているマウス ES 細胞を用いて、顎顔面領域の位置情報を持った組織の誘導法を確立する事を目標とする。

アニマルキャップとアクチビン A を用いると、位置情報を持つ様々な組織を試験管内で誘導できるが、マウス ES 細胞から位置情報を持った組織を誘導する方法についての報告はない。本研究では、無血清培養系を用いる事により、血清中の未知蛋白や増殖因子・誘導因子等の影響を排除できると共に、顎顔面領域の位置情報を持った組織の誘導のみならず、その組織の誘導の仕組みを明らかにする事ができる。位置情報を有した組織誘導法を確立すれば新たな組織発生研究及び再生医療への応用につながると思われる。

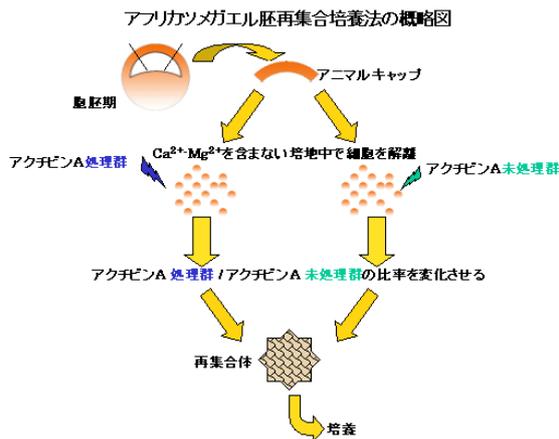
3. 研究の方法

1. アフリカツメガエルの顎顔面領域の形態形成に影響を及ぼす遺伝子の同定

1) これまでの研究で、アフリカツメガエル胚再集合培養系において、アクチビン A 処理群とアクチビン A 未処理群の混合比率が 1:5 の再集合体からは顎顔面領域の軟骨組織が誘導され、1:1 の再集合体からは後方の脊索が誘導される事が明らかとなっている。そこで、アフリカツメガエル再集合培養系にて、混合比率が 1:5 の再集合体と 1:1 の再集合体を作成し、アフリカツメガエル特異的 DNA マイクロアレイ法を用い、両者を比較し、1:5 再集合体で高発現する遺伝子群を明らかにする事により、頭部形成に関与する遺伝子の探索を行う。



2) 1)で検索し、1:5 再集合体において 1:1 再集合体と比較して 1.5 倍以上の発現上昇を認めた各遺伝子について、アフリカツメガエル正常胚の各発生段階における発現領域の比較検討を行う。発現領域の解析は、ホールマウントによる in situ ハイブリダイゼーション法及び切片を用いた in situ ハイブリダイゼーション法にて行う。



4. 研究成果

1. アフリカツメガエル胚再集合培養系を用いた遺伝子群の探索

Ca⁺⁺, Mg⁺⁺を含まないスタインバーグ氏液中でアニマルキャップを解離、分散させ、アクチビンAで25ng/mlで1時間処理したアクチビンA処理群と、アクチビンA未処理のまま1時間静置したアクチビンA未処理群を、1:5 あるいは 1:1 の比率で混合する事により、1:5 再集合体および 1:1 再集合体を形成した。培養1日目の各再集合体から全RNAを抽出し、アフリカツメガエル特異的DNAマイクロアレイ法にて、頭部組織より後方の脊索を誘導する1:1再集合体と比較して、顎顔面領域の軟骨組織を誘導する1:5再集合体で高発現する遺伝子群を明らかにする事により、頭部形成に関与する遺伝子の探索を行った。

その結果、検索した8000個の遺伝子のうち、51個の遺伝子が、1:5再集合体において、1:1再集合体と比較して1.5倍以上の上昇を認めた。上昇した51個の遺伝子のうち、神経堤形成に関与する遺伝子として、AP-2, PDGFRA, tiarin, Msx1, EDNRA, xsna, snail, twist 並びに Sox10 の9個の遺伝子が含まれていた。

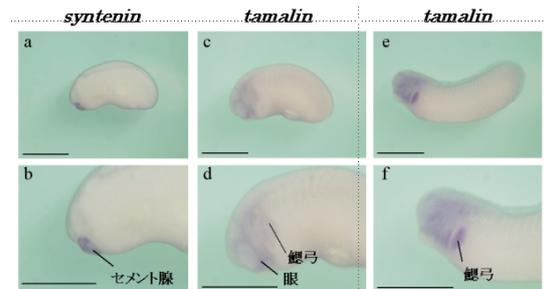
次に、これら遺伝子以外で、これまで頭部形態形成に関与する事が報告されていない遺伝子として *syntenin* および *tamalin* が 1:5 再集合体で約 1.7 倍上昇している事が明らかとなった。

2. *Syntenin* および *tamalin* の詳細な発現解析

1:5 再集合体および 1:1 再集合体における *syntenin* および *tamalin* の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、両遺伝子の mRNA は、1:5 再集合体において発現を認めたが、1:1 再集合体においては発現は認められなかった。

次に、WISH 法を用いて、DIG 標識 *syntenin* および *tamalin* の各プローブを用い、ツメガエル正常胚における各遺伝子の発現領域を検討した。その結果、*syntenin* mRNA は、st.

23 正常胚においてセメント腺のみに発現を認めたが、*tamalin* mRNA は、st. 20 および st. 28 正常胚において、鰓弓や眼球部に発現を認めた。そこで、ツメガエル正常胚および成体から切片を作製し、ISH 法を用いて *tamalin* の発現領域をさらに詳細に解析した。その結果、*tamalin* mRNA は、st. 40 正常胚において、顎軟骨部や眼球部に特異的に発現されている事、さらに成体においては、歯胚や口腔上皮にも発現されている事が判明した。



さらに、ツメガエル正常胚 st. 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 33, 35, 38, 40, 42, 45, 48 それぞれから全RNAを抽出し、RT-PCR法を用いて、各発生ステージにおける *tamalin* 発現の推移を検討した。その結果、st. 2 から 48 までの各発生ステージ全てにおいて *tamalin* mRNA の発現を認めた。

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0件)

[学会発表] (計4件)

1. 鍋島巧, 木村直大, 楠田美保, 岡本哲治, マウス人工多能性幹細胞(iPS)細胞の未分化性と多分化能を維持した単層無血清培養系の確立, 第64回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会, 平成22年6月25日, 札幌市

2. 岡本康正, 伊藤翼, 山崎佐知子, 岡崎文彦, 藤井良典, 鍋島巧, 竹末奈七子, 木村直大, 石田康隆, 浜名智昭, 福井康人, 角健作, 神田拓, 新谷智章, 小泉浩一, 吉岡幸男, 谷亮治, 林堂安貴, 虎谷茂昭, 小林雅史, 原潤一, 有田裕一, 坂本哲彦, 越智康, 谷本裕, 佐渡友浩, 芳村善道, 村上光寿, 間島徹, 阪本知二, 岡本哲治, 当科で治療した舌癌の臨床的検討, 第57回NPO法人日本口腔科学会中国・四国地方部会, 平成21年11月14日, 岡山県倉敷市

3. 鍋島巧, 福井康人, 明石靖史, 楠田美保, 浅島誠, 岡本哲治, アフリカツメガエル胚未分化細胞及びマウス胚性幹細胞を用いた顎顔面組織誘導研究, 第63回特定非営利活動

法人日本口腔科学会学術集会，平成 21 年 4 月 17 日，浜松市

4. 虎谷茂昭，谷亮治，藤井良典，松本真司，鍋島巧，竹末奈七子，木村直大，石田康隆，福井康人，北村直也，岡本康正，新谷智章，小泉浩一，小林雅史，吉岡幸男，岡本哲治，表在性口腔癌に対する光線力学療法(PDT)，第 63 回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会，平成 21 年 4 月 17 日，浜松市

〔その他〕

ホームページ等
無し。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍋島 巧 (NABESHIMA KOH)
広島大学・病院・歯科診療医
研究者番号：10550999

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：