

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670805

研究課題名(和文)切歯歯胚の外エナメル上皮には新規シグナリングセンターが存在するか？

研究課題名(英文)Does a novel signal center exist at outer enamel epithelium in incisor germ?

研究代表者

原田 英光 (Harada, Hidemitsu)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：70271210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：切歯の発生を調べる過程で、外エナメル上皮内に細胞を供給する特殊な領域を見いだした(dental epithelial bulge of outer enamel epithelium: DEB of OEE)。上皮特異的赤色蛍光マウスの透明標本による3次元的な観察から、唇側上皮は90度傾いた鐘状期歯胚の唇側部の外側から伸張していた。またDEB of OEEはG1/G0期の細胞集団として観察され、グリコーゲンを貯蓄細胞であることも明らかとなった。以上から、唇側上皮は外側歯堤の垂型であり、DEB of OEEは切歯唇側上皮の成長と上皮幹細胞ニッチ形成のための起点となっていると推測した。

研究成果の概要(英文)：In order to examine the mechanisms of apical bud (dental epithelial niche) development in a continuously growing mouse incisor, we had observed incisor germ growth using live cell imaging. We had found a special cell population (dental epithelial bulge of outer enamel epithelium: DEB of OEE), which supply some cells toward incisal end and distal end, in the outer enamel epithelium of labial dental epithelium. First, we attempted to analyze the detail morphology of a developing incisor germ using 3D imaging of sheet laser microscopy and CK14cre/Rosa26-tdTomato. The morphology is similar to a 90 degree rotated molar tooth germ, and exhibit a elongated labial dental epithelium. Next, we observed cell cycle using Fucci mouse and glycogen deposit by immunohistochemistry in DEB of OEE. The results showed that some cells in DEB of OEE showed cessation at G0 and accumulated glycogen. Considering with these results, we presumed that DEB of OEE is an important area for production of apical bud.

研究分野：口腔組織発生学

キーワード：エナメル上皮幹細胞 切歯 シグナルセンター 外エナメル上皮

1. 研究開始当初の背景

マウス切歯は、臼歯歯胚と異なって経常的に成長し続けるため、切歯の形成端には歯の幹細胞があることが知られている。我々は、マウス切歯の唇側サービカルループ上皮 (apical bud) にはエナメル上皮幹細胞が存在し、その維持に歯乳頭が発現する線維芽細胞増殖因子 10 (Fgf10) が重要であること、エナメル上皮幹細胞は SOX2 などの未分化性維持因子を発現していること、Cbfb や Rho シグナル系が細胞の極性形成を通じて幹細胞の維持に重要な働きをしていることなどを明らかにしてきた (J. Cell Biol., 1999, Development, 2002, 2006, J Cell Physiol., 2011, Stem Cell, 2011)。しかし、臼歯歯胚の発生とは異なり、なぜ切歯には apical bud が形成されるのかについてはわかっていない。そこで、GFP 発現マウスの切歯の発生過程での細胞の動きをライブイメージングで観察した。その結果、胎生 16 日齢のマウス切歯歯胚において唇側のエナメル上皮が伸張を開始する時期に、外エナメル上皮の中に切縁方向と形成端方向の両方に細胞を供給している特殊な領域 (ここでは dental epithelial bulge of outer enamel epithelium: DEB of OEE) と仮に呼ぶ) ができることを発見した (写真矢頭)。そこで、この領域の生物学的特性を解明して、臼歯とは異なる切歯発生の新しいメカニズムの発見を狙った研究を行う。



2. 研究の目的

本研究では、マウス切歯歯胚の発生過程を形態学的に、分子生物学的に検討して臼歯発生との違いを明らかにする。特に DEB of OEE の発生意義やその機能的意義を明らかにして、切歯発生の分子メカニズムの新規仮説を提唱することを目指す。

- 1) 切歯歯胚発生の過程を 3 次元的に構築して臼歯発生との違いを明確にする

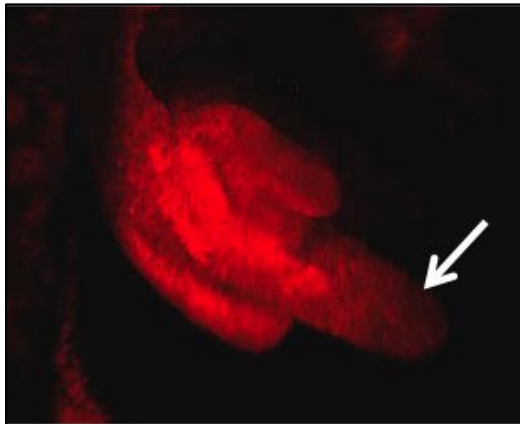
- 2) 胎生 16 日齢マウスの切歯唇側のエナメル上皮にみられる DEB of OEE での遺伝子発現やタンパクの局在を解析し、発現パターンから生物学的意義を推測する。
- 3) DEB of OEE の形成に関わる遺伝子群に対する機能喪失実験やタンパクの徐放ビーズを用いた機能獲得実験で遺伝子発現と DEB of OEE の形成関係を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) マウス切歯の発生過程での DEB of OEE の発生の形態学的解析
CK14cre マウスと ROSA26RTomato をかけあせて CK14cre/TdTomato を作製する。このマウスの下顎骨を固定した後、透明化処理を行い、シートレーザー顕微鏡にて 3 次元構築して観察した。発生過程にある切歯歯胚での形成端からの連続切片を作製して組織学的に dental bulge の位置や形態、細胞の桂太学的な特徴の観察を行った。
- 2) Fucci マウスを用いた DEB of OEE の細胞周期の観察
胎生 16 日の Fucci マウスの下顎切歯を取り出して、器官培養を行い、レーザー顕微鏡にて細胞周期の変化を連続的に観察した。
- 3) DEB of OEE における細胞特性の解析
DEB of OEE におけるタンパク発現を観察するために胎生 16 日の Fucci マウスの下顎切歯連続切片を作製して免疫組織学的解析を行った。
- 4) 中和抗体を用いて DEB of OEE の形態学的変化や遺伝子発現の変化をしらべた。

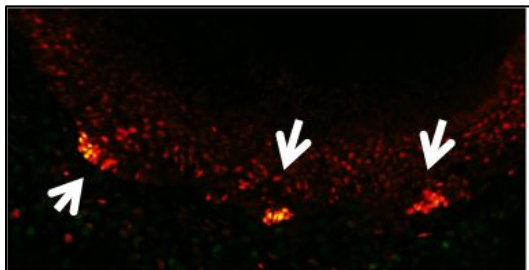
4. 研究成果

我々は、まず、胎生 14 日の切歯の発生過程での上皮特異的赤色蛍光マウスの下顎骨透明標本作製して観察した。歯堤に連続するように鐘状期歯胚が 90 度回転した歯胚がみられ、その唇側が遠心に向けて大きく膨らみ伸張した形態を呈していた。この切歯歯胚の 3 次元立体構築像を横断面を軸に唇側と舌側を 180 度回転させると下顎第 1 臼歯の像とよく似ていることを見いだした。下顎臼歯歯胚の歯堤の部分が切歯の唇側の上皮であるかのように見られた。



CK14cre/tdTomatoを用いた胎生期16日齢のマウス下顎切歯の3D像。90度傾いた鐘状期歯胚の唇側に遠心方向へ伸張する唇側のエナメル上皮が観察された(矢印)。

さらに、*fucci* マウスを用いて胎生期 16 日齢の下顎切歯唇側上皮の成長における細胞周期を観察したところ、DEB of OEE は細胞分裂を起こさずに、形態形成の起点となっている可能性が示唆された。



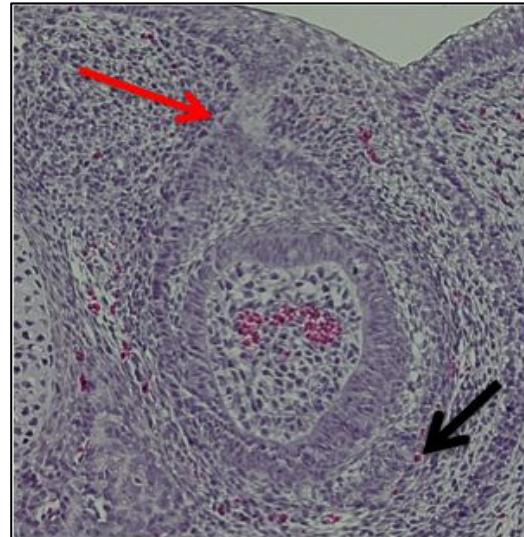
*Fucci*マウスを用いた胎生16日齢での切歯エナメル上皮の細胞周期観察。矢印はG0期に停止したサイレントな細胞集団として観察された。

次に同時期の下顎切歯の前頭断連続切片を作製して観察したところ、唇側に存在するDEB of OEE は舌側の口腔粘膜上皮との連絡を示す歯堤と形態的位置関係において深く関連しているように考えられた。

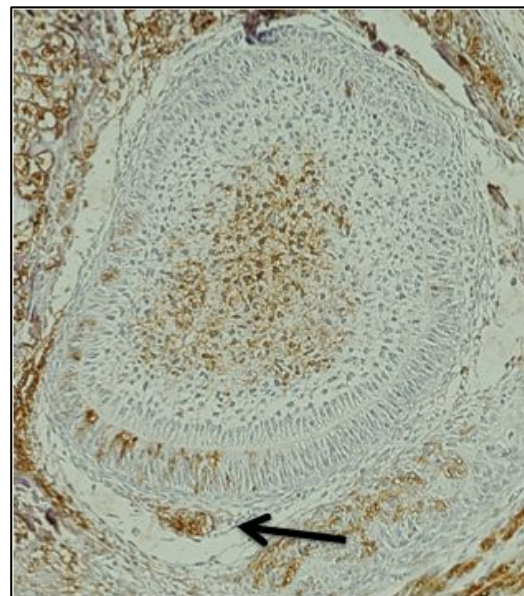
これらの部位における細胞生物学的特徴を調べるために免疫染色法にてタンパク発現等について調べた。その結果、グリコーゲンを貯蓄している細胞でもあることが明らかとなった。以上の結果から推測すると、唇側のDEB of OEE は切歯唇側上皮が伸張してapical bud を形成するためのシグナルセンターあるいは細胞の増殖移動のための起点として働いている可能性が示唆された。

今回の研究においては、中和抗体を用いた結果についてはいまだ十分に検証できていないため、データは割愛する。またノックアウトマウスやコンディショナルノックアウトマウス、遺伝子過剰発現マウスなどの解析は行われていないため、本質的な機能については推測の域を出ていない。今後さらに研究を進めて切歯発生とエナメル上皮幹細胞の二

ツチ形成のメカニズムを調べていく予定である。



胎生16日齢の下顎切歯の前頭断像。唇側上皮内に細胞極性を示さない細胞集団dental bulgeが観察された(矢印黒)。この反対側(舌側)には口腔粘膜と連続する歯堤が観察された(矢印赤)。



マウス下顎切歯前頭断。唇側エナメル上皮にDEB of OEE が観察され、グリコーゲンが貯蓄されているのが認められる(矢印)。

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 11 件)

- 1) Otsu K, Ida-Yonemochi H, Fujiwara N, Harada H. The Semaphorin 4D-RhoA-Akt Signal Cascade regulates enamel matrix secretion in coordination with cell polarization during ameloblast differentiation. **J Bone Miner Res.** 2016 May 24. doi:

- 10.1002/jbmr.2876. [Epub ahead of print]PMID:2721888
- 2) Bori, E, Guo J, Rácz R, Burghardt B, Földes A, Kerémi B, Harada H, Steward MC, DenBesten P, Antonius LJJ Bronckers ALJJ, Varga G. Evidence for bicarbonate secretion by ameloblasts in a novel cellular model. **J Dent Res.** 2016 May;95(5):588-96 doi: 10.1177/0022034515625939
- 3) Ida-Yonemochi H, Otsu K, Ohshima H, Harada H. The glycogen metabolism via Akt signaling is important for the secretion of enamel matrix in tooth development. **Mech Dev.** 2016 Feb; 139:18-30.doi:10.1016/j.mod.2016.01.002. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26809144
- 4) Lee MJ, Kim EJ, Otsu K, Harada H, Jung HS. Sox2 contributes to tooth development via Wnt signaling. **Cell Tissue Res.** 2016 Feb 4. [Epub ahead of print]PMID:26846112
- 5) Yokohama-Tamaki T, Otsu K, Harada H, Shibata S, Obara N, Irie K, Taniguchi A, Nagasawa T, Aoki K, Caliari SR, Weisgerber DW, Harley BA. CXCR4/CXCL12 signaling impacts enamel progenitor cell proliferation and motility in the dental stem cell niche. **Cell Tissue Res.** 2015 Dec;362(3):633-42.
- 6) Nakatomi C, Nakatomi M, Saito K, Harada H, Ohshima H. The enamel knot-like structure is eternally maintained in the apical bud of postnatal mouse incisors. **Arch Oral Biol.** 2015 Aug;60(8):1122-30
- 7) Masuda T, Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Ema M, Hitomi J, Sugiyama Y, Harada H. Combined Administration of BMP-2 and HGF Facilitate Bone Regeneration through Angiogenic Mechanisms. **J Hard Tissue Biol** 24[1] 2015 7-16
- 8) Mitsiadis TA., Harada H. Regenerated teeth: the future of tooth replacement. An update. **Reg Med**, 2015, 10(1), 5-8
- 9) Harada H, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Otsu K. Live imaging to elucidate cell dynamics in tooth organogenesis and regeneration. **J Oral Biosci.** 2015 57, 65-68
- 10) Kumakami-Sakano M, Otsu K, Fujiwara N, Harada H. Regulatory mechanisms of Hertwig's epithelial root sheath formation and anomaly correlated with root length. **Exp Cell Res.** 2014 Jul 15;325(2):78-82 Review
- 11) Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Kikuchi K, Keller L, Lesot H, Harada H. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. **Front physiol** 5(36):1-10 2014
- 〔学会発表〕(計 22 件)
シンポジウム
- 1) 原田英光, 熊上深香, 大津圭史, 藤原尚樹. イメージングから考える歯の形態形成機構の新規視点 第 57 回歯科基礎医学学会 9 月 11-12 日 新潟 (2015)
- 2) 原田英光 歯の再生治療に向けた戦略 第 25 回日本サイトメトリ学会 7 月 11-12 日 東京 (2015)
- 3) Harada H, Sahara Y., Horie S., Nakanishi-Matsui M., Matsumoto N., Ohshima H., Fujiwara N, Otsu K. Analysis of tooth development and bone remodeling using a3 isoform of V-H+ATPase -GFP and -deficient mice. 日本解剖学会・日本生理学会合同大会 3/21-23 Kobe 2015
- 4) 福本 敏、日野綾子、山田垂矢、大津圭史、新垣真紀子、齋藤 幹、中村卓史、原田英光：歯根発生過程における細胞骨格制御因子の役割とその異常 第 56 回 歯科基礎医学学会 学術大会・総会 9 月 25-27 日福岡 (2014)
- 5) 熊上深香、大津圭史、藤原尚樹、原田英光. 歯根発生メカニズムの新規仮説と歯根形態異常 第 56 回 歯科基礎医学学会学術大会・総会 9 月 25-27 日 福岡 (2014)
- 6) 岡 暁子、板家 智、吉良迪子、藤原尚樹、原田英光 歯周組織発生制御における HERS の新規役割 第 56 回 歯科基礎医学学会学術大会・総会 9 月 25-27 日 福岡 (2014)
- 7) 原田英光 藤原尚樹 熊上深香 大津圭史：ヒトの歯の再生を見据えた研究戦略と展望 (シンポジウム)

26 歯の再生). 第 13 回日本再生医療学会総会・学術大会. 3/4-6 京都(京都大学再生医科学研究所 主催) 2014

一般講演

- 1) 依田浩子、大津圭史、大島勇人、原田英光. Akt シグナルがグルコース代謝を促進しエナメル芽細胞分化を誘導する. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会 12/1-4 神戸 2015
- 2) Otsu K., Oku Y, Nishiya N, Fujiwara N., Harada H.: Regulation of stemness of dental epithelial stem cells by Rho-YAP signaling. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 新潟 2015 年 9 月 11-13 日(12 日) 新潟(2015)
- 3) 藤原尚樹、熊上深香、大津圭史、原田英光: マウス臼歯歯根成長における Rho signaling の役割. 日本解剖学会 第 60 回東北・北海道連合支部学術集会. 9 月 6 日 福島 2015
- 4) Oka K., Ogata K., Kira-Tatsuoka M., Tumuraya T., Fukushima H., Okamoto F., Osaki M., Harada H., Matsushita M., Okabe K. The role of TRPM7 channels in tooth mineralization. Tripartite Conference on Tooth and Bone; Development & Regeneration. Narita Japan, 6/12-14, 2015
- 5) Otsu K., Ida-Yonemochi H., Kumakami-Sakano M., Fujiwara N., Harada H. Regulation of dental epithelial cell differentiation by Rho signaling. Tripartite Conference on Tooth and Bone; Development & Regeneration. Narita Japan, 6/12-14, 2015
- 6) Fujiwara N., Ota M., Kumakami-Sakano M., Otsu k., Woo JT., Harada H. Stimulation of tooth root development by natural compound, harmine. Tripartite Conference on Tooth and Bone; Development & Regeneration. Narita Japan, 6/12-14, 2015
- 7) Ida-Yonemochi H., Harada H., Ohshima H. Role of glucose metabolism during ameloblast differentiation. Tripartite Conference on Tooth and Bone; Development & Regeneration. Narita Japan, 6/12-14, 2015

- 8) Kira-Tatsuoka M., Oka K., Harada H., Fujiwara N., Itaya S., Ozaki M., Sawa Y. Immunohistochemical expression of fibrillin-1 and fibrillin-2 during tooth development. Tripartite Conference on Tooth and Bone; Development & Regeneration. Narita Japan, 6/12-14, 2015
- 9) Ogata K., Oka K., Fukushima H., Tumuraya T., Okamoto F., Osaki M., Harada H., Matsushita M., Okabe K. The expression of TRPM7 channels in tooth development. Tripartite Conference on Tooth and Bone; Development & Regeneration. Narita Japan, 6/12-14, 2015
- 10) Otsu K., Kumakami-Sakano M., Masuda T., Fujiwara N., Harada H. Role of Semaphorin-Rho signaling in ameloblast differentiation. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 & 第 92 回日本生理学会大会合同大会 3 月 21 日-23 日 神戸 (2015)
- 11) 大津圭史、熊上-坂野 深香、増田智幸、藤原尚樹、原田英光: Semaphorin 4D - Rho A シグナルによるエナメル芽細胞分化制御. 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9 月 25-27 日 福岡 (2014)
- 12) 増田智幸、大津 圭史、藤原 尚樹、熊上深香、原田 英光: 骨修復に対する効果的なサイトカイン投与方法と血管新生とのかかわり. 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9 月 25-27 日 福岡 (2014)
- 13) 中富千尋、中富満城、齋藤 幹、原田英光、大島勇人: 生後マウス切歯 apical bud にエナメル結節様構造が恒久的に維持されている. 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9 月 25-27 日 福岡 (2014)
- 14) 坂野深香 大津圭史 藤原尚樹 原田英光: iPS 細胞由来神経堤細胞を用いた歯胚組織再生. 第 13 回日本再生医療学会総会・学術大会. 3/4-6 京都(京都大学再生医科学研究所 主催) 2014

〔図書〕(計 7 件)

- 1) 原田英光、大津 圭史、藤原 尚樹 口腔の生理から考える臨床像(16) 修復象牙質-歯髓の痛みと歯髓の治

癒の新しい関係 日本歯科評論
76(4):152-156 2016

- 2) 原田英光、大津 圭史、藤原 尚樹
口腔の生理から考える臨床像(14)
顎堤の吸収-歯と骨の切っても切れない関係とは 日本歯科評論
76(2):145-149 2016
- 3) 原田英光、大津 圭史、藤原 尚樹
口腔の生理から考える臨床像(13)
歯の発生-歯堤と呼ばれる歯の幹細胞集団 日本歯科評論
76(1):145-150. 2016
- 4) 原田英光、大津圭史 藤原尚樹 遣
伝子医学MOOK 別冊 細胞の3次元
組織化-その最先端技術と材料技術
株式会社メディカルドゥ 2014
- 5) 大津圭史、坂野深香、藤原尚樹、
原田英光 文献と臨床の橋わたし
歯の発生のメカニズムと先天性歯
科疾患(第1回)歯の数の異常を考え
る 日本歯科評論 74(1):147-149.
2014
- 6) 大津圭史、坂野深香、藤原尚樹、
原田英光 文献と臨床の橋わたし
歯の発生のメカニズムと先天性歯
科疾患(第2回)歯冠の形成異常とそ
こから見えてくるもの 日本歯
科評論 74(2):147-149. 2014
- 7) 大津圭史、坂野深香、藤原尚樹、
原田英光 文献と臨床の橋わたし
歯の発生のメカニズムと先天性歯
科疾患(第3回)歯根の異常を示す先
天性疾患とそのメカニズム 日本
歯科評論 74(3):151-153. 2014

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://oralhist.iwate-med.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 英光 (Harada, Hidemitsu)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：70271210

(2)研究分担者

藤原 尚樹 (Fujiwara, Naoki)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：20190100

大津 圭史 (Otsu, Keishi)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号：60509066

熊上 深香 (Kumakami, Mika)
岩手医科大学・歯学部・常任研究員
研究者番号：30710826