

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11005

研究課題名(和文) 歯胚形成におけるヒアルロン酸の発現と機能に関する研究

研究課題名(英文) Expression and roles of hyaluronan in tooth germ formation

研究代表者

柴田 俊一 (SHIBATA, Shunichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80187400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：HA合成酵素(Has)のマウス歯胚発育過程における遺伝子発現パターンを検索した。Has2 mRNAは歯胚周囲の間葉組織、Has3 mRNAはエナメル器、HERS、Apical Bud等の上皮組織に特異的に発現が認められた。したがってHas3が歯胚の発育や構造維持に関与している可能性が示された。Has3の機能を抑制するために、siRNAを器官培養系に添加し構造変化を検索したところ、歯胚におけるHas3 mRNAの発現は4割ほど減少したが、組織学的観察では大きな変化は認められなかった。よって、Has3の歯胚発育に関する作用は他のHas分子などで代償される可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：At first, hyaluronan synthase (Has) mRNA expression was investigated in developing mouse tooth germ. As results, Has 2mRNA was detected in mesenchymal tissues around tooth germ. Has3 mRNA was expressed in epithelium including enamel organ, Hertwig's epithelial shoes (HERS), and apical buds of incisor tooth germ. These results indicated that Has 3 is mainly involved in the formation or maintenance of crown and root of tooth germ. In order to knock down Has 3 function, siRNA was added to culture media in organ culture system. Compared to control groups, the expression of Has3 was 40% decreased in experimental groups, but no great morphological changes were identified by histological analyzes. Thus function of Has3 for tooth germ formation may be compensated by other molecules such as other types of Has families.

研究分野：anatomy

キーワード：tooth germ HA synthase (Has) Hyaluronan organ culture

1. 研究開始当初の背景

ヒアルロン酸 (HA) はプロテオグリカンのように蛋白質と結合せず単独で細胞外基質中に存在するグリコサミノグリカンで、皮膚を初め全身のほとんどの部位で存在する分子である。HA は各組織において多様な機能が報告されているが、歯においては歯髄組織に豊富に存在する事や、ヒト歯胚の星状網に発現が見られる事が知られているが、HA の歯胚形成過程における機能の具体的な検索は見られなかった。また哺乳類における HA 合成は3種類 (Has1, -2, -3) の HA synthase (Has) と呼ばれる分子によって行われている。各分子と合成される HA の性状との関係が注目されていたが、歯胚における Has 遺伝子の発現は一報簡単な報告があるが、詳細には検索されていなかった。またヒアルロン酸分解酵素 (Hyaluronidase) の歯胚形成に関する知見は、全く不明な状態であった。

2. 研究の目的

歯胚形成における HA の機能を形態学的、生化学的、さらには分子生物学的見地から明らかにし、それによって新たな歯胚発育制御機構を開発する事を目的とした。さらにこれまで HA の医学における応用例として変形性関節炎における関節液の補填材や美容整形時の補填材への応用、あるいは健康補助食品としての利用がなされてきたが、本研究によって HA を用いた新規の材料工学の発展も視野に入れて研究を行った。

3. 研究の方法

(1) HA 合成酵素 (*Has1-3*)、分解酵素 (*Hyal-1,-2*) の遺伝子発現の定量

マウス臼歯・切歯を摘出し、上皮成分と間葉成分を切り離し Total RNA 抽出後、リアルタイム PCR 法にて *Has1-3* および *Hyal-1,-2* 遺伝子の発現量を定量する。

(2) 歯胚発育過程における HA および関連分子の発現

歯胚形成初期から硬組織形成期、さらには生後の萌出過程に到るまでのマウス臼歯・切歯において、合成された HA の局在を検索するとともに、HA 合成酵素 (*Has1-3*)、HA 分解酵素 (*Hyal-1,-2*) の遺伝子の発現を in situ hybridization 法で検索する。

(3) 器官培養系を用いた HA 合成阻害実験
器官培養系を用いて、*Has1-3* 遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドあるいは siRNA を培地に添加したときの歯胚の形態形成の変化を形態学的、分子生物学的に解析する。

4. 研究成果

(1) HA 合成酵素 (*Has1-3*)、分解酵素 (*Hyal-1,-2*) の遺伝子発現の定量

Has1 mRNA は実験期間中の歯胚において検

出できなかった。*Has2* mRNA は E14.0 から認められ、E18.0 まで減少していた一方、*Has3* mRNA は E16.0 で有意に増加し、その後 E18.0 まで維持されていた。また、歯胚を上皮と間葉とに分離して検索すると、*Has2* mRNA は上皮側よりも間葉側で 2 倍ほど高く発現し、*Has3* mRNA は間葉側より上皮側で有意差を持って顕著に高い発現量を示した (図 1)。なお *Hyl-1,-2* mRNA は顕著な発現が認められなかった。

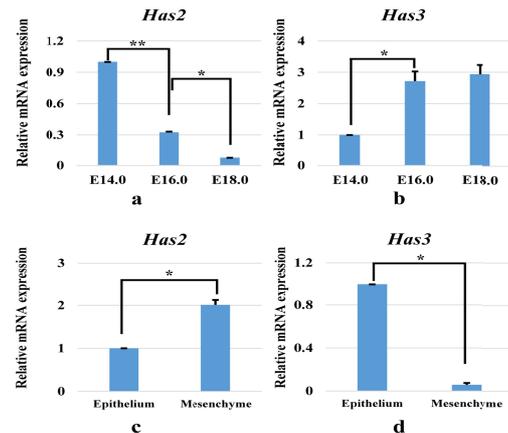


図 1 歯胚における *Has2*, *Has3* 遺伝子発現の経時変化(a, b)と上皮と間葉での発現量の違い (c, d)

(2) 歯胚発育過程における HA および関連分子の発現

Has1 mRNA に関してはいずれの段階で検出できなかった。*Has2* mRNA は E11.5 から間葉側に弱く発現しており、E12.0 から E13.0 で歯胚周囲の間葉組織において強く発現が認められたが、その発現は次第に減少し、出生後には消失した。*Has3* mRNA は E11.5 で dental placode に発現し、E12.0 では tooth bud に、E13.0 ではエナメル器に発現していた。E14.0 および E15.0 では内エナメル上皮および星状網で強く発現していたが、一次エナメル結節および外エナメル上皮では認められなかった。E16.0 では中間層においてもその発現が認められた。E18.0 では内エナメル上皮、星状網および中間層では認められたが、分化期エナメル芽細では消失していた。出生後では、中間層と HERS で引き続き発現していたが、星状網では消失していた (図 2)。

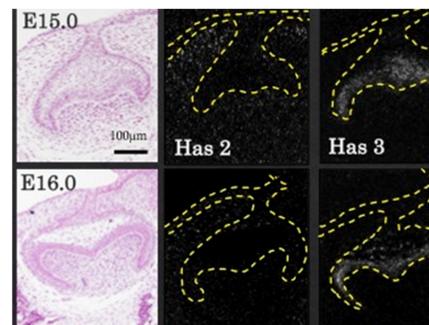


図 2 胎齢 15.0-18.0 臼歯歯胚における *Has2* および *Has3* mRNA の発現

引き続き切歯歯胚における *Has* mRNA の発現について検索した。*Has2* mRNA は E13.0 では tooth bud と間葉組織において弱く検出され、その後歯乳頭において弱く認められたが、E18.0 以降ではその発現は認められなかった。*Has3* mRNA は E13.0 では tooth bud において強く認められ、E14.0 では内エナメル上皮に発現していたが、外エナメル上皮には認められなかった。E16.0 および E18.0 では、*Has3* mRNA は唇側の apical bud 内の TA 細胞や中間層、陥入した内エナメル上皮で強く発現していたが、舌側の apical bud では認められなかった。出生後では、*Has3* mRNA の発現は TA 細胞領域と成熟したエナメル質近傍の乳頭層で認められた (図 3)。

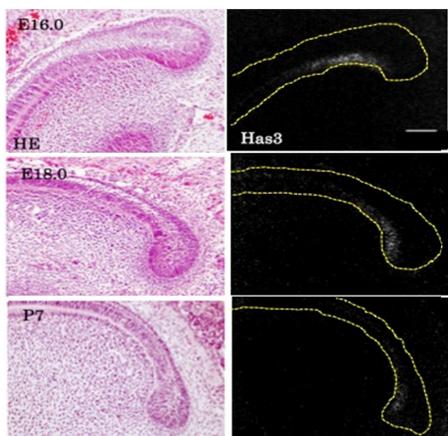


図 3 切歯歯胚 Apical bud における *Has3* mRNA の発現

以上のことから *Has3* 分子のうち、*Has3* が、上皮組織であるエナメル器に継続的に発現していたことから、エナメル器で合成された *Has3* は出生前および出生後の歯胚の HA 合成のための重要な調節因子である可能性が示唆された。また *Has3* mRNA の発現は HERS において継続的に検出されたことから、*Has3* を介した HA 合成により HERS の構造が維持されている可能性が示唆された。さらにマウス切歯は apical bud 内に幹細胞が存在し、HA が幹細胞ニッチの主な細胞外基質であることが報告されている。本実験では、*Has3* mRNA は TA 細胞領域において認められ、HA の局在は apical bud においては星状網でのみ認められた。以上のことから、TA 細胞により HA が apical bud 内の星状網に合成されていると推測され、*Has3* を介した HA 合成は apical bud 内の幹細胞ニッチの維持に影響している可能性が示唆された。

なおヒアルロン酸分解酵素 (*Hyl-1*, *-2*) は検索した限りでは明瞭な遺伝子発現は認められなかった。

(3) 器官培養系を用いた HA 合成阻害実験

(1)(2)の結果から *Has3* が歯胚の形成や構造維持に重要である可能性が示唆されたため、*Has3* 遺伝子に対する siRNA を培地に添加したときの歯胚の形態形成の変化を検索した。siRNA 下での 7 日間の器官培養後、歯胚における *Has3* mRNA ノックダウンの効果はコントロールと比較して、4 割ほど下方制御された。実態顕微鏡下で歯胚全体の大きさを観察したところ、実験群は対照群と比較して全体的に小さい傾向を示した。また、咬頭頂部から歯頸部までの長さに関して、実験群は対照群と比較して短いものが観察された。しかしながら、臼歯歯胚におけるノックダウンの影響を組織学的に検討するため、パラフィン包埋した後、厚さ 5 μ m の切片を作成し、HE で染色した後に光学顕微鏡にて観察したところ、内エナメル上皮や象牙芽細胞の形態に関して、実験群は対照群と比較して大きな変化は認められなかった (図 4)。

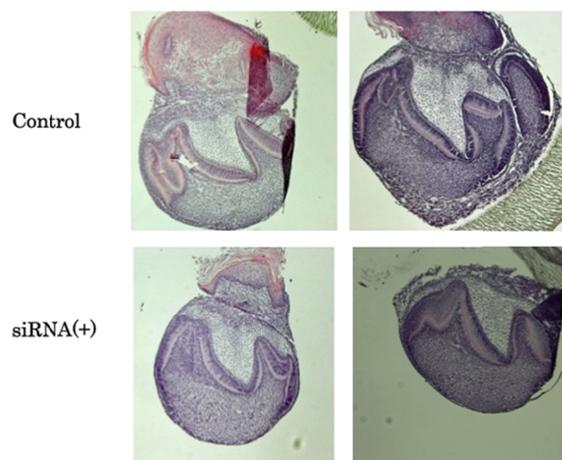


図 4 コントロール群と siRNA 添加群における歯胚の形態

以上のことから *Has3* を介する歯胚の HA 合成は他の分子、特に *Has-1*, *-2* など他の *Has* family によって代償されている可能性が考えられた。

本研究を通して歯胚形成における *Has* 分子、特に *Has3* が時間、空間的に特異的な遺伝子発現パターンを示す事が明らかになり、この分子の歯胚形成への関与の可能性を示した事は大きな成果であると考えられた。しかしながら、この分子の詳細な機能を検索するための阻害実験では明瞭な効果を確認する事は出来なかった。今後はこの実験系における *Has-1*, *-2* の代償的発現の有無の検索、あるいは 2 種あるいは 3 種の *Has* 遺伝子発現を同時にノックダウンする実験系を確立する事で、歯胚発育における HA の機能がより明らかになる事が期待される。

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 18 件)

Obara N, Suzuki Y, Irie K, Shibata S. Expression of planar cell polarity genes during mouse tooth development. Arch Oral Biol, 査読有, 83:85-91, 2017. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.07.008

Shibata S, Jin ZW, Jin Y, Zhao P, Murakami G. Immunohistochemistry for matrix proteins in newly formed mandibular condylar cartilage in a human fetus. Anat Physiol, 査読有, 7: 262, 2017. doi: 10.4172/2161-0940.1000262

Sato R, Fukuoka H, Yokohama-Tamaki T, Kaku M, Shibata S. Immunohistochemical localization of tenascin-C in rat periodontal ligament with references to alveolar bone remodeling. Anat Sci Int, 査読有, 91:196-206, 2016. doi: 10.1007/s00441-015-2248-y

Morita T, Fujikawa K, Baba O, Shibata S. An *in situ* hybridization study of *Hyaluronan synthase (Has)* mRNA in developing mouse molar and incisor tooth germs. Gene Expr Patterns, 査読有, 21:28-40, 2016. doi: 10.1016/j.gep.2016.06.002

Ida-Yonemochi H, Otsu K, Ohshima H, Harada H: The glycogen metabolism via Akt signalling is important for the secretion of enamel matrix in tooth development. Mech Dev, 査読有, 139:18-30, 2016. doi: 10.1016/j.mod.2016.01.002

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, 査読有, 31:1943-1954, 2016. doi: 10.1002/jbmr.2876

Fujikawa K, Yokohama-Tamaki T, Morita T, Baba O, Qin C, Shibata S. An *in situ* hybridization study of *perlecan*, *DMP1*, and *MEPE* in developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible and limb bud cartilage. Eur J Histochem, 査読有, 59:2553, 2015. doi: 10.1177/0003489415606450

Shibata S, Morita T, Yokohama-Tamaki T, Murakami G, Cho BH. An immunohistochemical study of matrix components in early-stage vascular canals within mandibular condylar cartilage in midterm human fetuses. Anat Rec, 査読有, 298:1560-1571, 2015. doi: 10.1002/ar.23175

〔学会発表〕(計 14 件)

Shibata S. Structural features of tooth germ after accelerate mineralization in organ culture system. 2017 International Frontier meeting of Craniofacial and Oral Science, 2017.2.11.

依田浩子, 森田 航, 柴田俊一, 大島勇人 コンドロイチン硫酸は頭蓋顔面形態形成を制御している. 第 57 回歯科基礎医学会総会 2016.8.25.

藤川芳織, 高橋将人, 柴田俊一 マウス下顎頭軟骨発生過程における Syndecan family の遺伝子発現に関する研究 第 57 回歯科基礎医学会総会 2016.8.25

Shibata S. Expression of Hyaluronan synthase (Has) in developing mouse molar and incisor tooth germ. 2015 Frontier meeting in Hong Kong, 2016.2.12.

Morita T, Fujikawa K, Shibata S. Expression of hyaluronan synthase (Has) in developing mouse tooth germ. 第 62 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 2015.10.30

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柴田 俊一 (SHIBATA, Shunichi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・教授

研究者番号：80187400

(2)研究分担者

田巻 玉器 (TAMAKI, Tamaki)

北海道大学・歯学研究院・専門研究員 (平成 27 年 9 月 24 日 削除)

研究者番号：80187400

依田 浩子 (IDA, Hiroko)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：60293213