

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15674

研究課題名(和文) ヒト顎関節オルガノイド作製への挑戦

研究課題名(英文) Tissue engineering of Temporomandibular joint organoids

研究代表者

井上 佳世子(野澤佳世子)(NOZAWA-INOUE, KAYOKO)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：90303130

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)：顎関節原基オルガノイドを作製するには、顎関節の発生における分子メカニズムの理解が必須である。しかし、その基礎となる顎関節の発生初期における各構成体の出現時期や部位にも、未だ不明な点が多い。本研究ではマウス胎仔の体重を基準として顎関節の発生の正確な開始時期と部位の同定が可能であることを明かにした。また顎関節形成予定領域に Runx2とSox9の発現が認められ、その3次元解析から、下顎頭原基は下顎体と連続して発生することが示唆された。一方、顎関節の母体外発生誘導法として各種器官培養法を検討したが、現行の改良法では正常な顎関節の発育が継続されず、新規培養法の開発が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Understanding the molecular mechanisms in regulating the temporomandibular joint (TMJ) development is essential for generating TMJ tissue engineering. However, even the phase and place of TMJ initiation that are necessary to analysis of molecular mechanisms are not established yet. We could define the suitable embryos in this study which were selected by their body weight, not by the fatal date. Runx2 and Sox9 were expressed in the presumptive region of the TMJ. Furthermore, 3D analysis for these gene expressions indicated that the condylar anlage was connected with the periosteum of the developing mandibular ramus. We also used organ culture techniques, but morphologically and genetically normal TMJ was not obtained by the modification of the ordinary methods. These results suggested that the completely new method of organ culture was required for the future study of TMJ tissue engineering.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：組織・細胞 歯学 口腔解剖 顎関節

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節は咀嚼・嚥下・発音など、様々な口腔機能において重要な役割を担う。顎関節疾患の多くを占める顎関節症はその機能に著しい障害をきたすが、明らかな原因解明には至っておらず、治療は対症療法にとどまっている。その病因および詳細な病態が解明されない理由の一つに、ヒト顎関節の特殊性による基礎研究の遅れがある。

哺乳類の咀嚼形態は、餌や捕獲方法、また四足歩行から直立二足歩行という姿勢の変化に合わせて各動物で多様に変遷し、それに伴って顎関節も進化してきた。この動物固有という特性は、ヒトの顎関節研究に動物実験の結果が直接反響できないことを意味している。特に、ヒト顎関節の発生メカニズムを分子生物学的に解析することは、ヒト胎児の試料の稀少性から、ほぼ不可能である。そのため、動物実験に代わる第三の実験方法が必要とされるが、未だ確立されていない。

近年、細胞を制御された空間に集積させ、3次元的に自己組織化した細胞組織体を形成させることが可能となってきた。人工的に作製した器官との意味から、オルガノイド (organoid) と呼ばれている (Science 345: 124-125, 2014)。オルガノイドは、細胞の由来器官と同様の特性をもつとされ、入手困難な組織の研究への応用が期待されている。iPS細胞の開発により、ヒトの細胞から顎関節形成細胞を作成することが、理論上は可能となった。そのため、ヒト iPS細胞を応用して顎関節原基オルガノイドを作製することにより、ヒト胎児に代わる新しい実験モデルを確立できる可能性がある。その確立のためにはまず、顎関節原基を形成する細胞へと iPS細胞を正確に分化誘導させる分子メカニズムの把握が必須となるが、現在までのところ、その遺伝子群は明らかにされていない。こうした分子生物学的解明が遅れている理由の一つに、下顎頭、下顎窩や関節円板など、顎関節の各構成体へ分化予定の細胞の出現から分化が、構成体別に、しかも極めて短時間で起こるため、それらの正確な位置や時期について未だ定説がないことが挙げられる。

## 2. 研究の目的

マウスの顎関節形成過程はヒトとは若干異なるとされるものの、マウスの遺伝子解析量や遺伝子変異の種類は、他の動物を圧倒的に凌駕している。特に遺伝子変異マウスでは、顎関節の異常が多数報告されており、遺伝子変異マウスの顎関節発生における情報は顎関節形成細胞への分化誘導メカニズムの解明には必須となる。このような理由から、現段階での幹細胞誘導メカニズム解明には、マウスによる分子発生生物学実験が最も効果的と考えられる。顎関節発生メカニズム研究へのマウスの使用にあたって、大きな課題となるのは先に述べた各構成体の発生時期と位置の正確な把握である。下顎頭の発生様

式については二つの説があり、下顎頭原基が下顎体と別の部位に間葉細胞の凝集として発生し、軟骨塊を形成したのちに下顎体と融合するという説と、下顎頭原基が下顎体から伸展するという説である。未だ結論に至らないのには、二つの要因が影響している。一つは、顎関節の発生が極めて短時間に起こるため、胎児の日齢のみでは顎関節発生段階を正確に特定できないことにある。これを解決するためには、新たな胎児発生段階の鑑別法の確立が必要となる。もう一つの要因として、顎関節が形成される際の3次元的な形態の把握が難しいことが挙げられる。発生過程を確認する方法には、組織切片を用いた形態学的手法が一般的である。組織切片により詳細な形態は観察できるものの、3次元的な把握は困難である。そのため、組織切片を基礎として、明確に3次元的な形態を把握する方法の確立が必須となる。本研究では、顎関節原基となる細胞への iPS細胞の分化誘導分子メカニズムを解明することを目標に、新たな胎児発生段階鑑別法と、組織切片を基礎とした3次元的な形態把握法を確立し、顎関節の発生時期と部位を同定することを目的とした。また、数時間で劇的に変化する顎関節発生機構の解析には、特に顎関節原基を形成する細胞が凝集する直前の、顎関節形成予定領域の発生を母体外で正常に継続させる必要がある。そのため本研究では顎関節培養方法の検討も併せて行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 胎児の顎関節発生の形態学的検索

胎児の日齢は、腔栓の確認により行われるのが一般的である。しかし腔栓の存在は、交配の時期を時間単位で特定できるものではないため、顎関節のように数時間で大きく変化する器官形成には、他の把握方法が必要となる。腔栓以外による胎児の発生段階の確認方法には、2時間ごとに正確に形成される体節数を胚齢の目安にする方法がある。しかし、顎関節形成の開始時期とされる胎生 14.5 日付近では、皮膚の透明性が失われ、体節数の正確な把握が困難となる。そのため現段階では、胎生 14.5 日付近の胎児の発生段階を数時間単位で正確に決定できる方法は存在しない。さらに、マウスは出生時には同腹仔間でその大きさに違いは認められないものの、顎関節形成開始時期である胎生 14.5 日の同腹仔間には若干の大きさの違いが認められる。つまり、同腹仔であっても発生レベルが違うことを意味している。予備実験において、胎生 14.5 日の各同腹仔の体重を計測したところ、CD1系統では 140mg から 350mg までの胎児が確認できた。そこで、マウス胎児の体重に着目し、顎関節形成段階との関連性を組織学的手法により観察した。

### (2) 胎児の体重別による顎関節発生の分子レベルでの検索

分子レベルでの変化は、形態的变化の前に生じることは知られている。(1)の実験で顎関節原基の形態が認められる以前の段階において、骨や軟骨マーカーなど様々な分子の発現を、in situ hybridization および免疫染色法にて確認した。

#### (3) 顎関節の初期発生の形態学的、分子生物学的3次元検索

(1)と(2)の実験で得られた顎関節の形成開始時期における形態学的変化ならびに遺伝子発現を、3次元画像処理システム Amira® (株式会社マックスネット)を用いて3次元的に構築し、把握した。

#### (4) 顎関節原基培養方法の検索

iPS細胞を顎関節原基となる細胞へ分化誘導するには、連続的な遺伝子操作が必要と考えられる。マウス顎関節の発生初期では、形態の大きな変化と同様に、その分子変動も数時間単位で引き起こると考えられる。それらの短期間の変化をマウスの子宮内で検討することは不可能であり、顎関節を子宮外で正常に培養する手法が必須である。そこで、発生生物学的研究で現在使用されている各種器官培養法を顎関節の母体外発生誘導法として用いることが可能かどうか検討した。具体的には(1)、(2)、(3)の実験により、顎関節形成前と判断した正常マウスの頭部を、Trowell法による器官培養、回転ドラム方式による全胚培養、回転ドラム方式と頭部部分器官培養の併用にて培養し、形態と分子の両面から顎関節形成過程を検索した。

### 4. 研究成果

#### (1) 胎子の顎関節発生の形態学的検索

マウスの系統により胎子の体重は異なるが、CD1系統では胎生14.5日において、140mgから350mgまでの幅広い体重の胎子が獲得された。各々の組織切片を作成し、顎関節の形態学的検討を行った。

350mg付近の重さの胎子では、顎関節の形成開始より比較的進んだ状態で、のちに下顎頭となる間葉細胞の凝集は下顎体に連続していた(図1)。

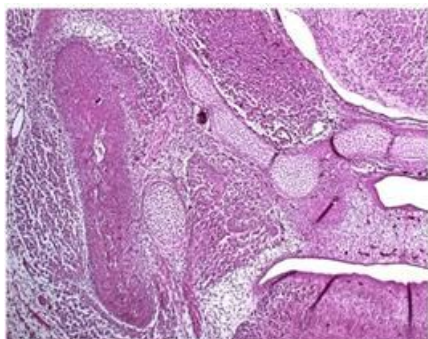


図1 胎生14.5日・体重350mg.

一方、250mg以下の胎子では、下顎頭原基出現予定の領域に、より幼弱な状態の間葉細胞

の凝集が、下顎体とは連続せずに観察された(図2)。



図2 胎生14.5日・体重191mg.

このように同じ胎生14.5日でも、胎子によって顎関節の形成段階は大きく異なり、それらは胎子の体重とは関連していることが確認された。このことから、胎子の体重を利用することで、顎関節の発生開始の時期と部位の同定が可能であることが明らかとなった。

#### (2) 胎子の体重別による顎関節発生の分子レベルでの検索

顎関節原基となる細胞へiPS細胞を誘導する分子の同定は、形態変化より前の段階での検索が必要となる。(1)の結果から、顎関節が幼弱な段階である140mg付近の体重の胎子において、様々な分子の発現を検索した。中でも、骨のマーカーであるRunx2(図3)と、軟骨のマーカーであるSox9の発現(図4)が、顎関節形成予定領域に確認された。

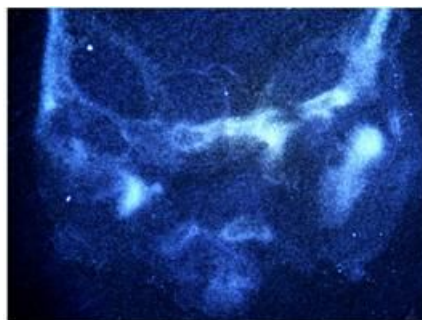


図3 Runx2発現・胎生14.5日・140mg.

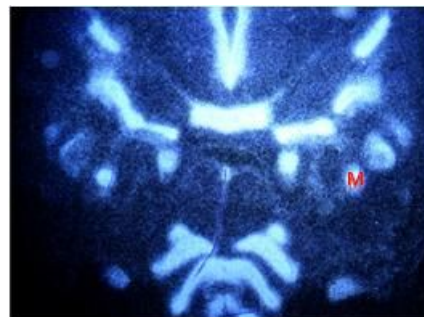


図4 Sox9発現・胎生14.5日・140mg  
M:メッケル軟骨

(3) 顎関節の初期発生の形態学的、分子生物学的3次元検索

(2)の実験において認められた Runx2 と Sox9 の発現を3次元構築した結果、下顎頭原基となる間葉細胞が凝集する時期の前後を通して、それらの発現ドメインに断裂は認められなかった(図5, 6)。このことから、下顎頭原基となる細胞は下顎体と連続して発生している可能性が示唆された。

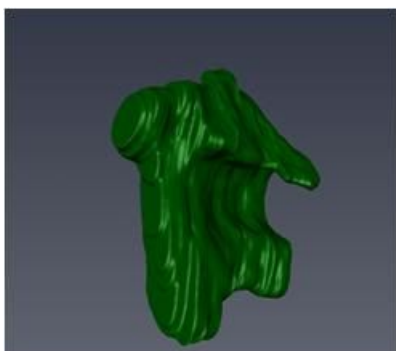


図5 Runx2 発現(頬側面観)

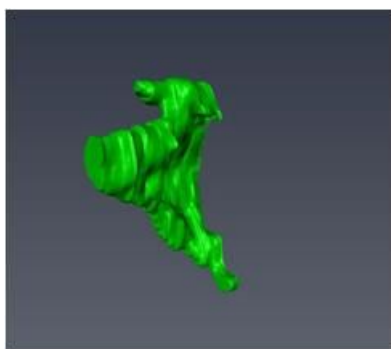


図6 Sox9 発現(頬側面観)

(4) 顎関節原基培養方法の検索

正常マウスの頭部を、Trowell 法による器官培養、回転ドラム方式による全胚培養、回転ドラム方式と頭部部分器官培養の併用にて培養し、顎関節形成を形態および分子レベルで確認した。その結果、回転ドラム方式と頭部部分器官培養の併用法により、顎関節の発生が培養中も継続することが見出された。この方法で、間葉細胞の凝集直前の組織から細胞凝集への誘導は可能になったものの、培養液浸透を促すために頭部を一部除去することが、培養後の組織の方向性を失わせ、その後の解析の精度を低下させることとなった。事前の組織染色等を加えることで方向性の精度を向上させるべく現在も検討を継続中である。

形態学的には一定の成果が得られたが、この培養顎関節において遺伝子解析を行った結果、遺伝子発現は正常の顎関節と若干異なっていた。血清の量や培養液、酸素分圧など複数の条件を変えて培養を試みたものの、分子レベルで正常な顎関節は形成されなかった(図7)。

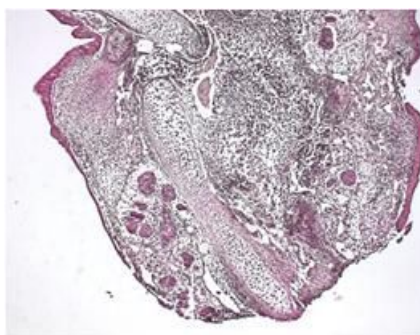


図7 器官培養後

このように従来の培養法を基本に工夫を加えた方法では、分子レベルまで完全に正常な顎関節発生を誘導することは困難であり、全く新たな培養法の確立が必要であると思われる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

野澤-井上 佳世子, 前田 健康 他, 医歯薬出版, 口腔組織・発生学 第8章 顎関節の発生, 2015, 246-252.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井上 佳世子(野澤 佳世子)

(NOZAWA-INOUE, Kayoko)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号: 9 0 3 0 3 1 3 0

##### (2) 研究分担者

前田 健康(MAEDA, Takeyasu)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 4 0 1 8 3 9 4 1

大峽 淳(OHAZAMA, Atsushi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 4 0 2 6 6 1 6 9

河野 芳朗(KAWANO, Yoshiro)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号: 6 0 3 0 3 1 2 9

(平成27年8月24日削除)