

機関番号：32650

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008~2010

課題番号：20592151

研究課題名 (和文) マイクロアレイで検出された歯牙形成遺伝子候補は本当に歯牙形成に関与しているか？

研究課題名 (英文) Are odontogenesis-related genes detected with microarray really involved in odontogenesis?

研究代表者

村松 敬 (MURAMATSU TAKASHI)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00276982

研究成果の概要 (和文) : 再生医療は発生生物学を中心とした形態形成メカニズムの研究に基づいて行われており、歯牙再生においても歯牙発生の研究が基礎となる。しかし歯牙発生においては再生させるのが難しく、現在までに完全な歯牙再生は実現されていない。歯原性上皮と間葉の相互作用の研究として、Palmer と Lumsden (Arch Oral Biol 32:281-289, 1984) の実験より歯牙形成に関与する遺伝子が胎生 16 日から生後 3 日の間に歯乳頭において消失されたことが推測される。そこで出生前後のマウス臼歯歯乳頭から RNA を抽出し、マイクロアレイにて比較検討し、出生前後で消失した遺伝子を検索したところ、*Adamts4*、*Aldh1a2*、*Lef-1* が減少することが明らかとなった。これらの遺伝子が本当に歯牙形成に関与しているのか明らかにするため、生後の歯髓細胞に遺伝子導入して、確認することを本研究では目的とした。その後、歯原性上皮との組み合わせでマウス腎臓被膜下に移植実験を行ったが、歯冠形成には至らなかった。本研究の結果からは、歯牙形成において *Adamts4*、*Aldh1a2*、*Lef-1* は歯牙形成には関与しているものの、生後歯髓においては歯牙形成には関与していないものと考えられた。

研究成果の概要 (英文) : Important factors involved in odontogenesis in mouse dental papillae disappear between the pre- and post-natal stages of development. Therefore, we hypothesized that certain genes involved in odontogenesis in dental papillae were subject to pre-/post-natal down-regulation. Our goal was to identify, by microarray analysis, which genes were down-regulated. Dental papillae were isolated from embryonic 16-day-, 18-day- (E16, E18), and post-natal 3-day-old (P3) murine first mandibular molar germs and analyzed by microarray. The number of down-regulated genes was 2269 between E16 and E18, and 3130 between E18 and P3. Drastic down-regulation (fold change > 10.0) of *Adamts4*, *Aldh1a2*, and *Lef1* was observed at both E16 and E18, and quantitative RT-PCR revealed a post-natal reduction in their expression (*Adamts4*, 1/3; *Aldh1a2*, 1/13; and *Lef1*, 1/37). These results suggest that down-regulation of these three genes is an important factor in normal odontogenesis in dental papillae. To confirm whether these genes are involved in odontogenesis or not, we constructed expression vectors of these genes. We transfected the genes into adult pulp cells and combined with dental epithelium, and transplanted under kidney capsule. However, odontogenesis could not be seen histologically. Further investigation is necessary to confirm that these genes are involved in odontogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：病理学・口腔病理学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯牙形成性能、歯胚、歯乳頭、遺伝子導入、歯牙再生

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療は発生生物学を中心とした形態形成メカニズムの研究に基づいて行われており、歯牙再生においても歯牙発生の研究が基礎となる。しかし歯牙発生においては再生させるのが難しく、現在までに完全な歯牙再生は実現されていない。歯原性上皮と間葉の相互作用の研究として、Palmer と Lumsden (Arch Oral Biol 32:281-289, 1984) の実験より歯牙形成に関与する遺伝子が胎生 16 日から生後 3 日の間に歯乳頭において消失されたことが推測される。

### 2. 研究の目的

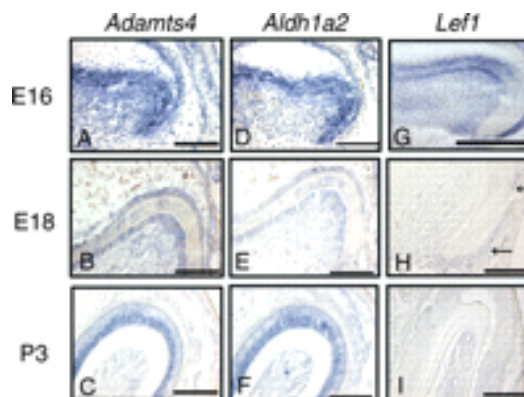
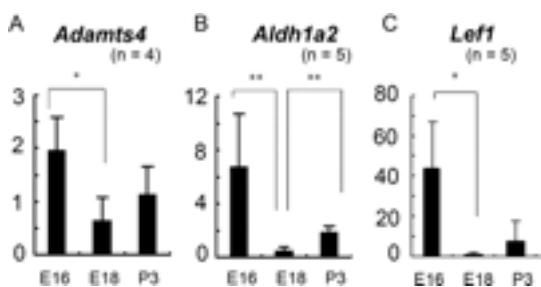
出生前後のマウス臼歯歯乳頭で消失した遺伝子を検索し、最終的にこれらの遺伝子が本当に歯牙形成に関与しているのか明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

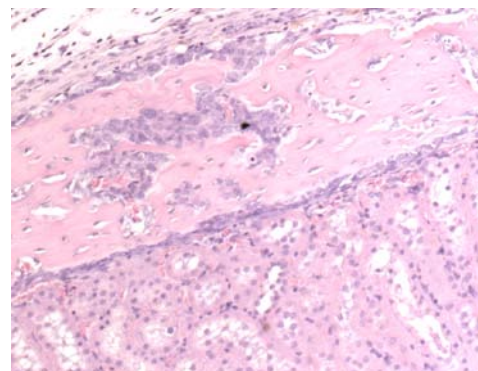
出生前後のマウス臼歯歯乳頭から RNA を抽出し、マイクロアレイにて比較検討した。また、ここで消失した遺伝子に対してベクターを作製し、生後の歯髓細胞に遺伝子導入し、組織学的に検索した。

### 4. 研究成果

マイクロアレイにて比較検討し、出生前後で消失した遺伝子を検索したところ、*Adamts4*、*Aldh1a2*、*Lef-1* が減少することが明らかとなった (J Dent Res 89(7): 679-683, 2010)。これらが実際に減少しているのかを確認するため、定量的リアルタイム PCR 法と in situ hybridization 法で確認したところ、生後 3 日目で明らかに減少していることが確認された。



これらの遺伝子が本当に歯牙形成に関与しているのか明らかにするため、生後の歯髓細胞に遺伝子導入し、歯原性上皮と合わせてマウス腎臓被膜下に移植実験を行ったが、歯冠形成には至らなかった。



本研究の結果からは、歯牙形成において *Adamts4*、*Aldh1a2*、*Lef-1* は歯牙形成には関与しているものの、生後歯髓においては歯牙形成には関与して異なるものと考えられた。

### 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 18 件)  
Sato K, Muramatsu T, Hashimoto S, Shimono M. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. Oral Diseases 16(3): 263-268, 2010. 査読有

Sugisawa M, Muramatsu T, Hashimoto S, Shimono M. Expression and function of laminin and integrins on adhesion/migration of primary culture cells derived from rat oral epithelium. *Journal of Periodontal Research* 45: 284-291, 2010 査読有

Okumura R, Shibukawa Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Shimono M. Sodium-calcium exchangers in rat ameloblasts. *Journal of Pharmacological Sciences* 112(2): 223-230, 2010. 査読有

Tsumura M, Okumura R, Ichikawa H, Muramatsu T, Kajiya H, Momose Y, Tazaki M, Shimono M, Shibukawa Y.  $Ca^{2+}$  extrusion via  $Na^+-Ca^{2+}$  exchange in rat odontoblasts. *Journal of Endodontics* 36(4): 668-674, 2010. 査読有

Sasaki H, Muramatsu T, Kwon HJ, Yamamoto H, Hashimoto S, Jung HS, Shimono M. Down-regulated genes in mouse dental papillae and pulp. *Journal of Dental Research* 89(7): 679-683, 2010. 査読有

Enokiya Y, Hashimoto S, Muramatsu T, Jung HS, Shimono M. Effect of stretching stress on gene transcription related to early-phase differentiation in rat periodontal ligament cells. *Bulletin of Tokyo Dental College* 51(3): 129-37, 2010. 査読有

Kamioka N, Akahane T, Kohno Y, Kuroki T, Iijima M, Honma I, Ohba M. Protein kinase C  $\delta$  and  $\eta$  differently regulate the expression of loricrin and Jun family proteins in human keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 394:106-11, 2010. 査読有

Masaoka T, Muramatsu T, Jung HS, Yamada S, Shimono M. Immunolocalization of laminin and integrin regenerating junctional epithelium of mice after gingivectomy. *Journal of Periodontal Research* 44(4):489-495, 2009 査読有

Tsuchiya Y, Muramatsu T, Shimono M. Effect of dental adhesive, 4-META/MMA-TBB resin on adhesion and keratinization of

regenerating oral epithelium *Journal of Periodontal Research* 44(4):496-502, 2009 査読有

Onizawa K, Muramatsu T, Shimono M. Low-level (gallium-aluminum-arsenide) laser irradiation of Par-C10 cells and acinar cells of rat parotid gland. *Lasers in Medical Sciences* 24:155-161, 2009 査読有

Kinumatsu T, Hashimoto S, Muramatsu T, Shimono M. Involvement of laminin and integrins in adhesion and migration of junctional epithelium cells. *Journal of Periodontal Research* 44(1):13-20. 2009 査読有

Yamamoto H, Cai J, Cho SW, Kim JY, Jung HS: Periodontal tissue formation by reaggregation system in mice, *J Hard Tissue Biology*, 18(2): 77-82, 2009.

Lee MK, Muramatsu T, Uekusa T, Lee JH, Shimono M. Heat stress induces ALP activity and HSP25 expression in cultured dental pulp. *International Endodontic Journal* 41(2):158-62. 2008 査読有

Suzuki K, Sakae T, Yamamoto H, Kozawa Y: Three-dimensional observation of the enamel prisms of *Subhyracodon* Molars, *International Journal of Oral-Medical Sciences*, 7(2): 113-118, 2008. 査読有

Muramatsu T, Uekusa T, Masaoka T, Saito M, Hashimoto S, Abiko Y, Jung HS, Shimono M. Differential expression and localization of connexin 26 and 43 in rat gingivalepithelium. *Archives of Histology and Cytology* 71(3):147-154, 2008. 査読有

Hoshino M, Hashimoto S, Muramatsu T, Matsuki M, Ogiuchi H, Shimono M. Claudin rather than occludin is essential for differentiation in rat incisor odontoblasts. *Oral Diseases* 14(7):606-12. 2008 査読有

Muramatsu T, Saito M, Ro Y, Uekusa T, Shimono M. Inhibition of syndecan-1 expression and function in oral cancer cells. *Oncology Reports* 20(6):1353-1357,

2008 査読有

Matsuzaka K, Muramatsu T, Katakura A, Ishihara K, Hashimoto S, Inoue T.

Changes in the homeostatic mechanism of dental pulp with age: expression of the core-binding factor alpha-1, dentin sialoprotein, vascular endothelial growth factor and heat shock protein27 messenger RNA. Journal of Endodontics 34(7):818-821, 2008 査読有

[学会発表] (計 25 件)

津村麻記, 澁川義幸, 村松 敬, 佐原資謹, 下野正基, 百瀬 弥寿徳, 田崎雅和  
象牙芽細胞における TRPV1/TRPV2 チャネル・CB1 受容体・Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換体の機能連関  
東京歯科大学創立 120 周年記念学術講演会・第 289 回東京歯科大学学会  
2010 年 5 月 7 日 東京

澁川義幸, 津村麻記, 市川秀樹, 村松 敬, 遠藤隆行, 山本 哲, 下野正基, 田崎雅和,  
象牙芽細胞におけるナトリウム-カルシウム交換機構 (NCX) によるカルシウム排出機構  
東京歯科大学創立 120 周年記念学術講演会・第 289 回東京歯科大学学会  
2010 年 5 月 7 日 東京

橋本貞充, 村松 敬, 鄭 翰聖, 山田 了, 下野正基  
付着上皮および長い付着上皮細胞の上皮付着形成のメカニズムについて  
東京歯科大学創立 120 周年記念学術講演会・第 289 回東京歯科大学学会  
2010 年 5 月 7 日 東京

村松 敬, 橋本貞充, 下野正基  
様々な刺激環境における歯髄細胞の反応  
東京歯科大学創立 120 周年記念学術講演会・第 289 回東京歯科大学学会  
2010 年 5 月 7 日 東京

津村麻記, 澁川義幸, 佐原資謹, 村松 敬, 市川秀樹, 遠藤隆行, 百瀬弥寿徳, 下野正基, 田崎雅和:  
ラット象牙芽細胞の TRPV1 を介する Ca<sup>2+</sup>シグナリング  
第 87 回日本生理学会  
2010 年 5 月 19 日~21 日 盛岡市

Muramatsu T, Ebihara K, Shibukawa Y, Hara A, Haku K, Hashimoto S, Shimono M.  
Low Glucose Condition Induces AMPKs

Expression in Dental Pulp Cells  
85<sup>th</sup> International Association for Dental Research (IADR) General Session,  
2010 年 7 月 14-17 日 Barcelona, Spain.

Tsumura M, Shibukawa Y, Muramatsu T, Shimono M, Momose Y, Tazaki M  
Receptor/channel expression of TRPV1/TRPV2/CB1 but not CB2 in rat odontoblasts  
85<sup>th</sup> International Association for Dental Research (IADR) General Session,  
2010 年 7 月 14-17 日 Barcelona, Spain.

高橋史子, 津村麻記, 澁川義幸, 村松 敬, 佐藤正樹, 市川秀樹, 下野正基, 田崎雅和  
象牙芽細胞における TRPM8 チャネルの発現の検索  
第 290 回東京歯科大学学会  
2010 年 10 月 16 日 千葉市

原 有沙, 村松 敬, 山口絢香, 國分克寿, 橋本貞充, 片倉 朗, 佐藤 裕, 下野正基  
口腔癌細胞における enolase 1 の機能解析  
第 290 回東京歯科大学学会  
2010 年 10 月 16 日 千葉市

菊地 陽, 村松 敬, 澁川義宏, 白 賢, 原 有沙, 橋本貞充, 下野正基:  
エムドゲインがマラッセ上皮遺残由来細胞に及ぼす影響  
第 290 回東京歯科大学学会  
2010 年 10 月 16 日 千葉市

白 賢, 村松 敬, 原 有沙, 榎谷保信, 橋本貞充, 下野正基:  
メカニカルストレス環境下でのマラッセ上皮遺残細胞の動態  
第 290 回東京歯科大学学会  
2010 年 10 月 16 日 千葉市

山本 仁, 新美寿英, 太田ルミ, 鈴木久仁博, 寒河江登志朗, 小澤幸重:  
横口蓋ヒダの有無による口蓋粘膜構造の違いについて:  
第 114 回日本解剖学会総会・学術集会,  
2009 年 3 月 28 - 30 日, 岡山市

新美寿英, 横田ルミ, 山本 仁, 鈴木久仁博, 小澤幸重:  
歯の形態形成-歯根との関連性について,  
第 114 回日本解剖学会総会・学術集会,  
2009 年 3 月 28 - 30 日, 岡山市,

鈴木久仁博, 山本 仁, 寒河江登志朗, 太田ルミ, 新美寿英, 小澤幸重:  
ハイイロネズミ

オポッサム (*Monodelphis domestica*) 臼歯の咬頭形成について,  
第 114 回日本解剖学会総会・学術集会  
2009 年 3 月 28 - 30 日, 岡山市

Sohn WJ, Jung HI, Choi MA, Yamamoto H, Shin HI, Lee SG, Jung HS, Kim JY: Molecular interactions and cellular events involved in palatal rugae development, 16th International Society of Developmental Biologists Congress,  
2009 年 9 月 6-9 日, Edinburgh United Kingdom of Great Britain

津村麻記、澁川義幸、市川秀樹、村松 敬、下野正基、田崎雅和：象牙芽細胞の TRPV1 チャネルを介した Ca<sup>2+</sup>シグナル  
第 288 回東京歯科大学学会(総会)  
2009 年 10 月 17, 18 日 千葉市

Yamamoto H, Kim JY, Muramatsu T, Shibukawa Y, Tazaki, M.: Immunohistological studies on the palatine rugae development in mice,  
第 50 回日本組織細胞化学会総会・学術集会,  
2009 年 9 月 26 - 27 日, 大津市,

村松 敬、片倉 朗、柴山和子、佐藤 裕、吉成正雄、井上 孝：唾液を検体としたエイジングマーカーの検出  
第 285 回東京歯科大学学会  
2008 年 6 月 7 日 千葉

Masaoka T, Hashimoto S, Kinumatsu T, Muramatsu T, Enokiya Y, Sugisawa M, Yamada S, Jung HS, Shimono M. Immunolocalization of laminin and integrin in junctional epithelium after gingivectomy. 86<sup>th</sup> General session & exhibition of the IADR  
2008 年 7 月 2-5 日 Toronto, Canada

村松 敬、柴山和子、佐藤 裕、安彦善裕、橋本貞充、下野正基：唾液を検体としたエイジングマーカーの検出  
第 50 回歯科基礎医学会 総会・学術大会  
2008 年 9 月 23-25 日 東京

正岡孝康、橋本貞充、村松 敬、榎谷保信、下野正基：ラットの長い付着上皮における laminin  $\gamma$  2、integrin  $\beta$  4、integrin  $\alpha$  3 の免疫局在  
第 50 回歯科基礎医学会 総会・学術大会  
2008 年 9 月 23-25 日 東京

山本 仁、村松 敬、澁川義幸、新美寿英、太田ルミ、鈴木久仁博、寒河江登志朗、田崎正和、小澤幸重  
マウス横口蓋ヒダ形成時に一過性に出現する細胞群について  
第 50 回歯科基礎医学会 総会・学術大会  
2008 年 9 月 23-25 日 東京

片倉朗、作間 巧、菅原圭亮、恩田健志、高木亮、神山勲、大野啓介、高野伸夫、柴原孝彦、村松 敬  
唾液を用いた口腔癌のスクリーニング検査—プロテオームによる enolase-1 の発現の解析—  
第 53 回日本口腔外科学会総会  
2008 年 10 月 20, 21 日 徳島市

Yamamoto H, Muramatsu T, Shibukawa Y, Tazaki M: Properties of cells at the palatine rugae during palate development in mice.  
International Conference on Frontiers of Dental and craniofacial Research.  
2008 年 11 月 1 -3 日 北京、中国

Ishii A, Muramatsu T, Shinozaki N, Shibahara T.  
Modeling oral mucosa regeneration process by laser irradiation.  
-Localization of oral mucosal stem cells and precursor cells.  
2008 年 10 月 23-25 日 Busan

〔図書〕(計 4 件)  
包括的歯科治療のなかでどう生かす?  
歯牙移動による歯周組織再生療法  
林 治幸、村松 敬  
砂書房 東京 2009 年

山本 仁 (著分担)：移植歯胚の構造，エナメル質比較発生学懇話会著、エナメル質、その形成、構造、起源と進化、再生，蓼科印刷株式会社，東京，p237-245、2009 年

河野葉子 (著分担)：黒木登志夫 (監修)、許南浩 (編) 改訂 培養細胞実験ハンドブック 基本から最新の幹細胞培養法まで完全網羅 羊土社 p161-167, 2009 年

河野葉子 (著分担)：大田秀一 (編) 頭頸部・口腔細胞診アトラス、医療科学社 p250-257, 2009 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村松 敬 (MURAMATSU TAKASHI)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00276982

### (2) 研究分担者

山本 仁 (YAMAMOTO HITOSHI)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：80265165

河野 葉子 (KOHNO YOHIKO)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：40195681

下野 正基 (SHIMONO MASAKI)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00085771

### (3) 連携研究者

なし