

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592333

研究課題名(和文)

パールカン-SHH相互作用を介した細胞外環境による歯根形態形成制御機構の解明

研究課題名(英文)

A study of the dental root formation by extracellular environment through Perlecan-SHH interaction.

研究代表者

松村 達志 (MATSUMURA TATSUSHI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：70432648

研究成果の概要(和文)：

歯根形成の進行に伴いパールカンは上皮鞘基底膜から消失する一方でその分解酵素であるヘパラーゼは上皮鞘細胞へ限局する。そこでパールカンがヘパラーゼによって分解される過程で遊離されるソニックヘッジホッグ(SHH)が歯根形成に関わると仮説を立てた。本研究では *in vitro* でこの仮説の解明を試みたが、既存の系では歯根完成期までを再現する事は困難であった。そこで様々な手法で改善を試みるも残念ながら歯根完成期まで再現する系の確立には至らなかった。今後、これらの結果を基にさらなる歯根形成機構の解明につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：

While perlecan disappears from basal membrane of Hertwig's Epithelial Root Sheath (HERS) along with a progression of dental root formation, heparanase which is one of the digestion enzymes of perlecan migrates to epithelium cells of HERS. During the digestion process of perlecan by heparanase, Sonic Hedgehog (SHH) is cleaved as a secreted protein. Therefore, we hypothesized that SSH might play a crucial role to establish dental roots. Despite the fact that many approaches have been employed to establish the dental root formation *in vitro*, it was struggling to reveal this interaction yet. The longer incubation time and the usage of a different type of culture circumstance did not help to improve our goals. More explorations will be essential to achieve the dental root formation by extracellular environment in order to investigate the interaction between perlecan and SHH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯根形成、パールカン、SHH、PTCH、SMOH、ヘパラーゼ

1. 研究開始当初の背景

今日、再生医療に関する研究や臨床応用が脚光を浴びているが、そのほとんどが骨・粘膜など単一細胞によるものが中心であり複合組織かつ立体構造をもつ器官の再生までには至っていない。器官原基の形成過程は上皮および間葉組織の相互作用によって制御・形成されており、歯の発生過程も同相互作用によって制御されている。歯は他の器官と比べてサイズが小さい事・肝臓などと比較して血流にあまり依存しない事や動物実験を行なう場合に歯の欠損によって動物が死に至らない事などから、歯の発生の研究者のみならず、器官再生実験モデルとしても注目を集めている。

現在まで歯の発生は歯冠形成期を中心に研究が進んでいる。その形成過程において上皮組織と間葉組織の相互作用が重要な役割を示し、発生過程の各ステージにおける分化誘導シグナルとしてソニックヘッジホック (SHH) をはじめとする様々なサイトカインや増殖因子の関与が明らかにされてきた (T Matsumura et al., *Int J Dev Biol* 42: 1137-1142, 1998. MJ Tabata, T Matsumura et al., *J Histochem Cytochem* 51: 1673-1679, 2003. JG Liu, T Matsumura et al., *Eur J Oral Sci* 106: 143-146, 1998.)。これまで歯冠形成期のサイトカインや増殖因子を中心とした研究が進んできているため、歯根形成期のサイトカインや増殖因子はもとより細胞外環境の影響について未だ不明な点が多い。

代表研究者所属教室他ではこれまで、Runx2 がセメント芽細胞分化・基質形成に重要である可能性を明らかにしてきた。さらにヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) であるパールカンおよびその分解酵素ヘパラナーゼに着目し、免疫組織化学的手法により歯根形成の進行に伴いパールカンは上皮鞘基底膜か

ら消失すること、一方、ヘパラナーゼ局在は上皮鞘細胞へ限局することを明らかにした。これらの結果より、ヘパラナーゼが基底膜のパールカンを介してセメント芽細胞の分化・増殖に関与する可能性を報告 (A Hirata, H Nakamura, *J Histochem Cytochem* 54(10): 1105-1113, 2006.) している。さらに EGR-1・FGF2・FGFR-1 の発現分布よりヘパラナーゼ・パールカンとの関連について検討しているが、未だ関連因子の同定に至っていない。

これら歯根形成のメカニズムを明らかにする事は歯の発生・器官再生の基礎研究の発展のみならずデンタルインプラントに代わる歯の再生医療や副甲状腺機能低下症など歯の発生過程での異常に対する治療・新規歯周病の治療に寄与するものと考えられる。

2. 研究の目的

各因子の分布の検証のみでは各因子の機能的な解析を行えない。そこで *in vitro* で歯根形成期を再現出来る系を確立する事が不可欠となる。本研究では数少ない歯根形成期を再現出来る系として報告されている藤原法 (Fujiwara et al., *Cell Tissue Res* 320: 69-75, 2005.) を基に歯根形成を評価改良して、パールカンおよびヘパラナーゼによって分解される過程で遊離される SHH の歯根形成期での機能解析を行う事を目的とした。

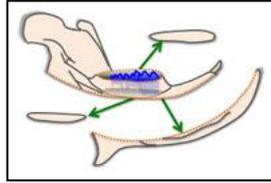
3. 研究の方法

(1) マウス下顎骨器官培養

① 下顎骨の処理

下顎第一臼歯が歯冠形成期から歯根形成期へ移行する ICR マウス 5 日齢より下顎骨を摘出し、氷温の Hanks へ浸漬。摘出された下顎骨を実体顕微鏡下で歯胚の上部と下部の硬組織を切除

して、歯胚へ培地が触れるようにした(右図)。



②培養 (藤原法)

24穴培養プレート (Nunc, Roskilde, Denmark)

にMillipore

Millicell-HA chamber

filterを挿入して、そ

の上に前記処理を行な

った下顎骨を静置した

(右図)。BGJb

(Fitton-Jackson

modification: Sigma)

にカナマイシン(60mg/L, Gibco BRL)、アスコ

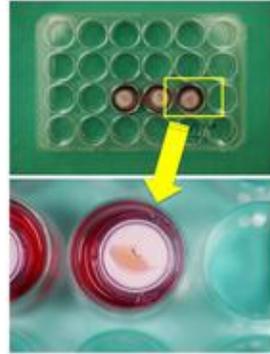
ルビン酸(0.1mM, Wako Pure Chemical

Industries)、BSA fraction V (1.25g/L,

Sigma) を添加した培地を用い、5% CO₂インキ

ュベータで培養した。培地交換は2日に一度行

なった。



③Trowell培養

培養 2 重皿 (Falcon3037) にステンレス製三

角メッシュとフィルタ (Millipore AABP04700)

をセットし、フィルタ上に同様の処理を行な

った下顎骨を静置した (下図)。培地は前記

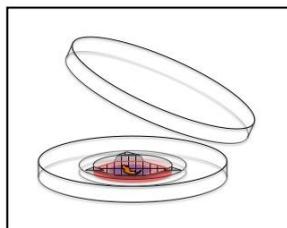
と同様の物を使用し、

5% CO₂インキュベ

ータで培養した。培地交

換は2日に一度行な

った。



(2)観察方法

①固定・脱灰

10%パラフォルムアルデヒドに常温で3日間浸

漬固定し、脱灰まで0.05M Phosphate Buffer

pH7.4に浸漬して4℃保存した。脱灰は5%EDTA

に4℃で10日間浸漬した。

②切片作成

通法通り、パラフィン包埋を行い、マイクロ

ームを用いて厚さ6 μmに薄切した。

凍結非脱灰切片の作成はサンプルをTCAコン

パウンドに埋没・凍結し、包埋後、川本法で

③染色

形態観察または歯根形成の評価では通法通り、

Hematoxyline-Eosin染色 (HE染色) を行な

った。

免疫組織染色

SHHには一次抗体に抗SHHゴートポリクローナ

ル抗体 (GTX14544; GeneTex, Inc.) を使用し、

発色はヒストファインDAB基質キット (ニチレ

イバイオサイエンス) を使用した。

パールカンおよびサイトケラチン14 (CK14)

では4%BSA-PBSでブロッキング後 (抗パールカ

ン抗体ではヒアルロニダーゼ前処理を施行)、

下記一次抗体/二次抗体で標識後、

Streptavidin-beta-gal conjugate

(Boehringer-Mannheim) で発色した。

一次抗体

抗パールカンマウスモノクローナル抗体

(A7L6; Millipore)

抗CK14マウスモノクローナル抗体 (LL002 ;

abcam)

二次抗体

Biotin-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (ZYMED

65-6140)

Biotin-Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) (ZYMED

61-1640)

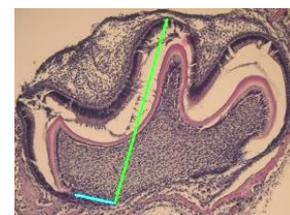
④歯根形成の評価

通法の形態観察に

加えて、ヘルトビッ

ヒ上皮鞘 (HERS) の

長さ (右図 青) /



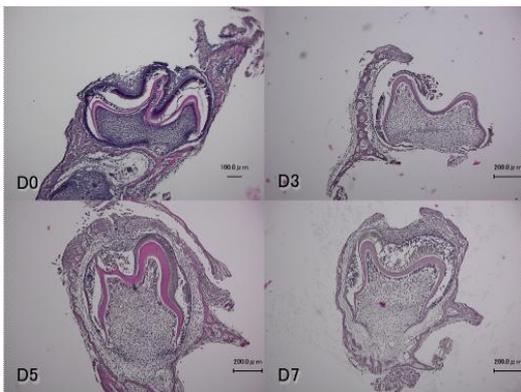
歯胚全長(脱灰されていない象牙質の頂点からHERSの先端まで、前図 緑)を計測してHERS/tooth ratioを求めた。

4. 研究成果

(1) 藤原法

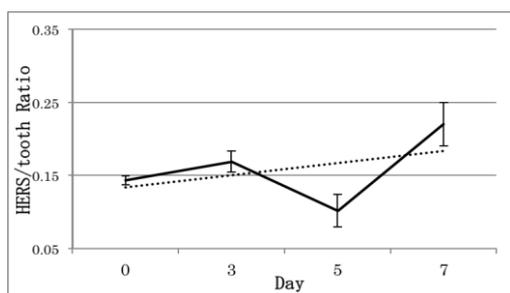
① 形態観察

藤原らの報告で行われている7日間培養をおこなった。HE染色を行い、形態観察した所、HERSが伸長している事を確認した(下図)。



② HERS-tooth ratio

そこでHERSの伸長を数値化するため、HERS/tooth ratioを測定した。測定結果は下グラフとなった。培養5日目まで数値は落ちるものの、下顎骨採取時を基準とした培養7日目のratio比は藤原らの報告とほぼ同等であった。

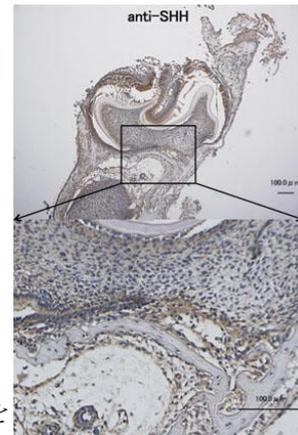


③ 培養歯胚におけるパールカンとSHHの免疫組織学的検討

パールカンは歯乳頭で強く発現しており、上皮鞘細胞での発現は非常に弱い結果となった。

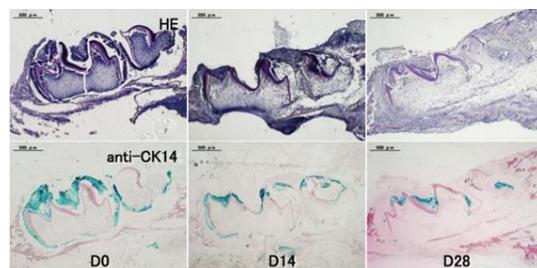


SHHは他で報告 (Nakatomi et al., J Dent Res 85(5): 427-431, 2006. 等) されているin situ hybridizationの結果より予想された分布であった。右図の如く、HERSを中心に歯乳頭へ広がっていた。



(2) Trowell培養

藤原法で7日間培養を行った場合、前述の通り、HERSの伸長を認めたものの、HERSが断裂して生じるMalassez上皮遺残を観察出来なかった。そこで長期培養を開始した。しかし、藤原法ではchamberに起因する培地交換の困難から培養が安定しない事その他、培地を多く使うため、将来的に阻害剤を用いた培養を行うには不利であった。そこで、本研究では歯冠形成期を観察するin vitroの系で成果を上げているTrowell培養法を応用した。この培養法は上記不利な条件をクリアした。しかし、下図の如く、培養期間が長期化するに従ってエナメル上皮が消失する事が観察された。下図上段はHE染色、下段はエナメル上皮のマーカであるCK14を示す。



(3) まとめと今後の展開

本研究では歯根形成期における各因子の機能解析を検証するin vitroの系の確立に努めた。HERSが伸長する過程まではin vitroで再現可

能であったが、HERSが断裂して生じる Malassez上皮遺残を再現出来る系を確立するには至らなかった。本研究結果を慎重に解析した所、下顎骨の処理など歯根形成期を検証する安定した系を確立するには様々な問題がある事が判明した。しかし、歯根形成期を検証する安定したin vitroの系の確立は急務である事に変わりはない。今後、この結果を新たな系の確立および歯根形成機構の解明に繋げていきたい。

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 19 件)

論文

①XS Li, P Trojer, T Matsumura, JE. Treisman, N. Tanese、Mammalian SWI/SNF-A subunit BAF250/ARID1 is an E3 ubiquitin ligase that targets histone H2B2.、Molecular and Cellular Biology、査読有、30(7)、2010、1673-1688

②A Hirata, T Tsuji, T Ueno, T Yamada, H Imura, T Kagawa, T Matsumura, N Moritani, K Mishima, T Sugahara, N Nakamura、Localization of heparanase during palatal bone formation in palatogenesis in mice.、Bone、査読有、44(2): S294-295, 2009.

③Kawaki H, Kubota S, Suzuki A, Yamada T, Matsumura T, Mandai T, Yao M, Maeda T, Lyons KM, Takigawa M.: Functional requirement of CCN2 for intramembranous bone formation in embryonic mice. Biochem Biophys Res Commun. 366(2):450-456, 2008.

④H Kawaki, S Kubota, A Suzuki, N Lazar, T Yamada, T Matsumura, T Ohgawara, T Maeda, BP Karen, M Lyons and M Takigawa、Cooperative regulation of chondrocyte differentiation by CCN2 and CCN3 revealed by a comprehensive analysis of the CCN family proteins in

cartilage.、Journal of Bone and Mineral Research、査読有、23(11)、2008、1751-1764

⑤ A Hirata, T Sugahara, H Nakamura、Localization of Runx2, osterix, and osteopontin in tooth root formation in rat molars.、J Histochemistry and Cytochemistry、査読有、57(4)、2008、397-403

〔学会発表〕(計 11 件)

発表

①平田あずみ、山田朋弘、植野高章、井村英人、香川智正、山近英樹、松村達志、森谷徳文、三島克章、菅原利夫、口蓋形成過程におけるヘパラン硫酸とヘパラーゼの役割、第54回日本口腔外科学会総会、2009年10月10日、札幌

②A Hirata, T Tsuji, T Ueno, T Yamada, H Imura, T Kagawa, T Matsumura, N Moritani, K Mishima, T Sugahara, N Nakamura、Localization of heparanase during palatal bone formation in palatogenesis in mice.、36th European Symposium on Calcified Tissues、2009年5月23-27日、Vienna

③平田あずみ、井村英人、山田朋弘、植野高章、山近英樹、森谷徳文、松村達志、香川智正、三島克章、菅原利夫、ヘパラーゼは基底膜パールカンよりbFGFを遊離することで口蓋突起癒合に関与する、第53回日本口腔外科学会総会、2008年10月20日、徳島、ゴールドリボン賞受賞

④A Hirata, H Imura, T Yamada, T Ueno, E Yamachika, N Moritani, T Matsumura, T Kagawa, K Mishima, T Sugahara、Heparanase contribute to palate fusion by degrading perlecan.、XIX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery、2008年9月9-12日、Bologna

⑤A Hirata, T Ueno, T Kagawa, T Matsumura, T Yamada, K Mishima, T Sugahara, H Nakamura、Localization of Runx2, osterix and osteopontin in cementogenesis in rat molars.、

35th European Symposium on Calcified Tissues、

2008年5月24-28日、Barcelona

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 達志 (MATSUMURA TATSUSHI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：70432648

(2) 研究分担者

平田 あずみ (HIRATA AZUMI)

大阪大学・大学院工学研究科・特任研究員

研究者番号：40263587

三島 克章 (MISHIMA KATSUAKI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60304317

山田 朋弘 (YAMADA TOMOHIRO)

高知大学・教育研究部・講師

研究者番号：60335619

森谷 徳文 (MORITANI NORIFUMI)

岡山大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60467751

田畑 純 (TABATA JYUN)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・准教授

研究者番号：20243248 (H21～H22)