

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592527

研究課題名（和文）

再集合培養系を用いたアフリカツメガエル未分化細胞からの歯牙及び顎顔面領域の誘導

研究課題名（英文）

Induction of tooth and craniofacial tissue from undifferentiated presumptive ectodermal *Xenopus* cell by aggregation culture method.

研究代表者

福井 康人（FUKUI YASUTO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90363085

研究成果の概要（和文）：

アフリカツメガエルアニマルキャップアッセイ，再集合培養を行った。再集合体内にアルシアンブルー・PAS 染色陽性の軟骨組織形成を認めた。次に再集合体をアフリカツメガエルの幼生腹部への移植実験を行った。変態完了後，脱灰標本にて PAS 染色で染まるアメロジェニン抗体に陽性の歯胚様構造を認めた。さらに再集合体を St23 幼生の下顎部位を除去した幼生に移植したが，アルシアンブルー陽性の軟骨組織を得られなかった。

研究成果の概要（英文）：

We used ectodermal *Xenopus* cell by aggregation culture method. Pas/Alcian blue stained positive cartilage tissue was observed in the aggregate. Next, we implanted the aggregate into the abdominal region of *Xenopus* embryo. We observed PAS/Alcian blue positive and Amelogenin positive tooth germ-like tissue in transplanted tissue after the host transformation. More, we implanted the aggregate to the embryo (St23) was excised region of lower jaw, we were not able to observe Pas/Alcian blue stained positive cartilage tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：アニマルキャップ、歯牙誘導、顎骨誘導

1. 研究開始当初の背景

アフリカツメガエルの受精卵は，卵割を繰り返して桑実胚と呼ばれるステージに達する。この時期の胚は，予定外胚葉にあたる動物半球と予定内胚葉にあたる植物半球から

なり，予定内胚葉域の細胞は，その上に位置する赤道面付近の帯域の細胞に対して，中胚葉誘導と呼ばれる分化誘導を起こす。中胚葉誘導を受けた細胞は，形成体（オーガナイザー）となり，形づくりのセンターとして，原

腸陥入運動を起こして胚内へと滑り込む様な移動運動を行う。さらに、内胚葉によって誘導された、将来脊索に分化する細胞を中心とした領域は、原腸陥入しながら表面を覆っている予定外胚葉に対して神経誘導を起こす。従って、中胚葉誘導は単に中胚葉という組織の分化のために必要であるだけでなく、初期発生における形態形成に不可欠な分子シグナルを発する場の形成に必要なステップであると考えられ、胚全体の形態形成や神経誘導を起こす上で非常に重要な現象である。1980年代半ばから FGF や TGF- β など、中胚葉誘導能を有する幾つかの分子が同定されてきた。(Tiedemann Zool Sci 7:171-186, 1990 Asashima Dev Growth Differ 36:343-355, 1994) なかでも TGF- β スーパーファミリーに属すアクチビン A は、両生類の胚の予定外胚葉に相当するアニマルキャップを用いるアニマルキャップアッセイにより強力な中胚葉誘導能を持つことが報告されてきた。アクチビン A の中胚葉誘導活性は濃度依存的で、低濃度では血球、体腔上皮、間充織が、中濃度では筋肉、高濃度では最も背側の中胚葉である脊索が誘導される。(Ariizumi, et al. Rou's Arch. Dev. Biol. 200:230-233, 1991) またアニマルキャップを一定時間アクチビン A で処理し、異なった時間前培養した後に再び別の未処理アニマルキャップ二枚で挟むサンドイッチ培養系では、前培養時間に依存して胴尾部から頭部までの組織が誘導される。(図1) (Ariizumi, et al. Dev. Growth Differ. 36:499-507, 1994) このように両生類胚アニマルキャップとアクチビン A を用いて *in vitro* で種々の臓器や器官を誘導できることが明らかとなってきている。(Okabayashi, et al. Curr Opin Genet Dev. 13:502-7, 2003) 我々はすでに、サンドイッチ培養法にてアフリカツメガエル幼生の顎顔面領域を限局的に形成することができることを報告しており、この事実は、部位特異的に臓器、器官を誘導できることを示唆している。(Furue et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 99:15474-15479, 2002.) さらに、より均一な組織を誘導できることが知られている再集合培養系(図2)ではサンドイッチ培養法と同様、顎顔面領域の位置情報を有する均一な軟骨組織を誘導することができることを報告した。(Myoishi, et al. International Journal of Developmental Biology (2004) 48 (10):1105-12)

一方、アフリカツメガエルは発生過程が早く、受精後4日で殆どの器官が形成され、現在報告されているアニマルキャップアッセイの培養期間は3-4日である。しかしながら、歯牙形成は、アフリカツメガエル幼生において、その器官形成時期が発生の後期に当たるため、アニマルキャップアッセイにおい

ても誘導に従来以上の培養期間が必要であり、一般的にアニマルキャップアッセイに使用されている培養液(Steinberg氏緩衝液; カエルの生理食塩水)では器官誘導が困難と予想されたため、我々は長期培養に適した培養液の開発し、その実用に至った。(Y. Fukui, et al. Dev. Growth Differ. 45:499-506, 2003)

2. 研究の目的

アニマルキャップサンドイッチ培養系および再集合培養系において部位特異的に臓器、器官を誘導出来ることが示唆されている。そこで、再集合培養系を用いて *in vitro* での歯牙を含む口腔領域の部域誘導を試み、その誘導に関与する遺伝子、分子群を明らかにし、再生医療への応用の可能性を探る。さらに、再集合培養において誘導された組織片は容易にアフリカツメガエル幼生への移植手術が可能であることより、誘導された組織片が生理的な機能を果たし、幼生の成長とともに成熟した器官として機能を果たすか否かの検討を行う。

3. 研究の方法

(1)再集合培養系

雌雄アフリカツメガエルに性腺刺激ホルモンを注射し、人工授精させ、受精卵を得る。実体顕微鏡下、アニマルキャップを切り出し、再集合培養を行う。培養の条件は、我々(Myoishi, et al. Int J Dev Biol. 2004 Dec;48(10):1105-12)が確立した、アクチビン A 25ng/ml で1時間処理した処理群とアクチビン A 未処理群の比率を1:5という条件で(場合によっては、さらに均一な軟骨組織を誘導できる条件をアクチビン A 処理群、未処理群の混合比率もしくはアクチビン A の処理濃度を変更することで検索)を行い、再集合体の培養は、我々が長期培養用に開発した RDX 培地を用いて30日間および45日間培養を行う。培養期間終了後、固定、切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色、アルシアンブルー・PAS染色を行い、再集合体内に口腔領域に相当する器官が形成されたか否か、また歯牙特有タンパクとして広く知られているアメロジェニンに対する抗体を用いて免疫染色を行い、再集合体内に歯牙誘導がなされたか否かを検討する。さらに同条件にて作成した再集合体より抽出したRNAを用いてRT-PCRを行い、アメロジェニンの発現を確認する。

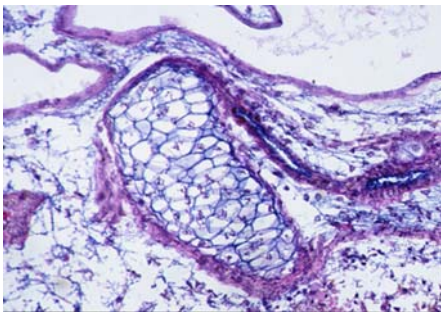


(2)アフリカツメガエル幼生への再集合体の移植実験

アニマルキャップアッセイにて誘導された臓器の幼生への移植実験は今までに行われており、腎臓の移植実験では、誘導された腎臓が生体内で十分に機能することが報告されている。(Naturwissenschaften. 1999 May;86(5):224-7.) 幼生に移植された移植片は、処理されたアクチビンAのみならず、幼生内の成長因子、増殖因子等の諸因子の影響を受け、*in vitro*での培養よりもさまざまな組織が誘導され、また宿主である幼生から供給される液性成分により、長期間生着が可能であると推測される。そこで、(1)にて検討した均一な軟骨組織を誘導できる条件下で作成した再集合体を stage 2 3 のアフリカツメガエル幼生の腹部に移植飼育後、固定、切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色、アルシアンブルー染色を行い、移植片内の組織誘導に関して検討する。また抗アメロジェニン抗体を用いて、免疫染色を行い、移植片内の歯胚もしくは歯牙の誘導の可能性を検討する。さらに再集合体を stage 2 3 の下顎部位を除去したアフリカツメガエル幼生移植し、捕食等の生理的機能を有するか否かの検討を行う。

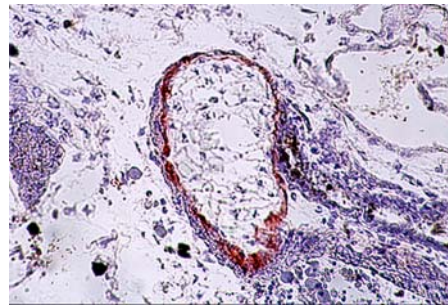
4. 研究成果

再集合培養をアクチビンA 25ng/ml で1時間処理した処理群とアクチビンA未処理群の比率を1:5という条件で行った。培養は、RDX培地を用いて30日間および45日間培養を行い、培養期間終了後、固定、切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色、アルシアンブルー・PAS染色を行い、再集合体内に口腔領域に相当する器官が形成されたか否かを検討したところ、再集合体内にアルシアンブルー・PAS染色陽性の軟骨組織の形成を認めた。



(アルシアンブルー・PAS染色 培養30日)

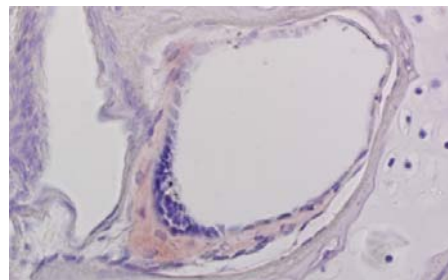
さらに、軟骨のマーカーである、Ⅱ型コラーゲン抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、アルシアンブルー・PAS染色陽性組織に一致して、Ⅱ型コラーゲンの発現を認めた。



(免疫組織染色 Ⅱ型コラーゲン)

アフリカツメガエル幼生では、軟骨組織は頭部のみ存在しているため、今回再集合体で形成された軟骨組織は、頭部領域の軟骨組織であることが推測された。また歯牙特有タンパクとして広く知られているアメロジェニンに対する抗体を用いて免疫染色を行ったが、アメロジェニンの発現を認める組織を確認することが出来なかった。

そこで、再集合体をアフリカツメガエルの幼生 (St23) の腹部への移植実験を行った。再集合体を幼生の腹部に移植し、飼育、母体の成長に伴い、再集合体も肥大を認めた。飼育後50日に変態完了したため、固定後脱灰標本を作成したところ、移植部にはPAS染色で赤紫色に染まる、骨組織および軟骨組織さらに歯胚様構造を認めた。



(アメロジェニン抗体陽性歯胚様構造)

さらに再集合体を stage 2 3 のアフリカツメガエル幼生の下顎部位を除去したアフリカツメガエル幼生移植し、捕食等の生理的機能を有するか否かの検討を行ったところ、再集合体は幼生の下顎部位に対して大きすぎ、正常に機能しないため、成長することができなかった。そのため、再集合体に用いるアニマルキャップの細胞を通常の半量にて再集合体を作成 (処理群と未処理群の比率は同じ) し、器官形成を確認したが、目的とするアルシアンブルー陽性の軟骨組織を得ることができなかった。

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2件)

1. 虎谷茂昭、福井康人、岡本哲治ら 広島大学病院顎・口腔外科における過去14年間の顎矯正手術の臨床統計的検討 広島大学歯学雑誌 査読有 43 2011 P91-97
2. 福井康人、虎谷茂昭、他4名 オトガイ部知覚異常を初発症状とした側頭下窩に進展した筋肉内脂肪腫の1例 日本口腔外科学会雑誌 査読有 55 巻 2009 P580-584

〔学会発表〕(計2件)

1. 福井康人、虎谷茂昭、岡本哲治ら 口蓋に生じた多形腺腫由来筋上皮癌の一例 第56回日本口腔外科学会総会・学術大会 2011年10月21日 大阪
2. 福井康人、吉岡幸男、岡本哲治ら ガンマナイフが著効した難治性三叉神経痛の一例 日本口腔科学会学術集会 2009年4月17日 浜松

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 康人 (FUKUI YASUTO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：90363085

(2) 研究分担者

岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00169153

虎谷 茂昭 (TORATANI SHIGEAKI)
広島大学・病院・講師
研究者番号：90172220

(3) 連携研究者

()

研究者番号：