

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03122

研究課題名(和文)皮膚の付属器官発生における老化活性の機能解明

研究課題名(英文) Studying for mechanism of senescence activity in skin appendage development

研究代表者

大峡 淳 (Ohazama, Atsushi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40266169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯の再生の実現には幹細胞の利用が欠かせない。しかし、幹細胞の歯胚細胞への正しい分化誘導という最も重要な部分の解決が未だなされていない。歯は、毛髪などと同じ皮膚の付属器官に属する。全ての皮膚の付属器官が先天的に欠如する遺伝性疾患の存在は、胎生幹細胞がダイレクトに歯胚細胞へ分化するのではなく、皮膚の付属器官への運命決定を行った後に、歯胚細胞への分化を決定している事を示している。皮膚の付属器官の発生において、老化シグナルが発現していることが確認された。その発現部位やパターン、その発現強度は、器官間で異なることに加え、同じ器官の中でも、時期により大きく異なっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の再生は、21世紀で成し遂げるべき医療であり、その実現には幹細胞の利用が必要となる。そのためには、幹細胞の歯胚細胞への正しい分化誘導法の理解が欠かせない。歯は皮膚の付属器官の一つである。本研究では、皮膚の付属器官の発生器官中に老化シグナルが発現することを見出した。本研究結果は、幹細胞を用いた歯の発生治療の確立に大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Teeth regeneration require the use of stem cells. However, it remains unclear how stem cells are directed into tooth forming cells. Teeth and hair belong to skin appendages. All skin appendages are absent in some genetic disease, which indicate that embryonic cells differentiate into tooth forming cells after determining their fate as skin appendages, but not direct differentiation into tooth germ cells from embryonic cells. We found senescence in skin appendage development. The expression pattern and its intensity were differed between stage in same organ, and between organs.

研究分野：発生生物学

キーワード：老化 器官形成

1. 研究開始当初の背景

歯の再生は、21世紀で成し遂げるべき医療であり、その実現には幹細胞の利用が欠かせない。しかし、幹細胞の歯胚細胞への正しい分化誘導という最も重要な部分の解決が未だなされていらない。一般に、器官発生は、胎生幹細胞が少しずつ、より細かな方向へ運命決定をしていくことで達成される。歯は、毛髪などと同じ皮膚の付属器官に属する。全ての皮膚の付属器官が先天的に欠如する遺伝性疾患の存在は、胎生幹細胞がダイレクトに歯胚細胞へ分化するのではなく、皮膚の付属器官への運命決定を行った後に、歯胚細胞への分化を決定している事を示している。胎生幹細胞を、どの付属器官へ分化させるかを決定するメカニズムの解明は、歯の再生における幹細胞の歯胚細胞への分化誘導に必須であるが、未だ明らかでない。

2. 研究の目的

全ての皮膚の付属器官は上皮と間葉から発生し、発生初期段階において蕾状の上皮と凝集した間葉という共通した形態を呈した後、各器官独自の形態へと変化していく。予備実験として行なった毛髪原基、歯胚におけるマイクロアレー解析において、歯の発生中に多くの老化関連分子が発現することを見出した。本研究では、皮膚の付属器官の発生メカニズムにおける老化シグナルの解析を行なった。

3. 研究の方法

正常マウスを用いて、老化シグナルの分子レベルでの検索を行なった。p21、p53 欠損マウスにおける表現型の解析を行なった

4. 研究成果

予備実験として行なった毛髪原基、歯胚におけるマイクロアレー解析において、歯の発生中に多くの老化関連分子が発現することを見出した。そこで、初めに歯胚において老化シグナルが活性化しているかを、senescence-associated β -galactosidase (SA- β -GAL)にて解析した。SA- β -GALの発現が、歯胚で認められたが、歯種や、歯の発生時期によって、活性部位や活性強度に大きな変化が認められた(図1)。毛包においても、SA- β -GALの発現は認められ、歯胚と同様に、発生時期によって、活性部位や活性強度に大きな変化が認められた(図2)。皮膚の付属器官としての認識はされていないものの、歯や毛髪原基と類似した遺伝子発現を示す口蓋皺壁にも、老化シグナルが認められた(図3)。老化シグナルに関連することが知られるヒストン修飾も確認できた(図4)。

過去に、胎生期の指や腎臓の原器に、老化シグナルが発現することが報告されている (Muñoz-Espín et al., Cell. Nov 21;155(5):1104-18.2013, Storer et al., Cell. Nov 21;155(5):1119-30.2013)。それらの器官での老化シグナルは、p53に依存しないp21により惹起された老化シグナルであることが報告されている。そこで、歯胚や毛包において認められた老化シグナルが、いかなる経路に依存しているかを明らかにするために、歯胚と毛髪原器におけるp21とp53の発現を検索した。上皮と間葉の両方で老化シグナルが認められる時期の歯種の歯胚で検索を行った。歯胚上皮

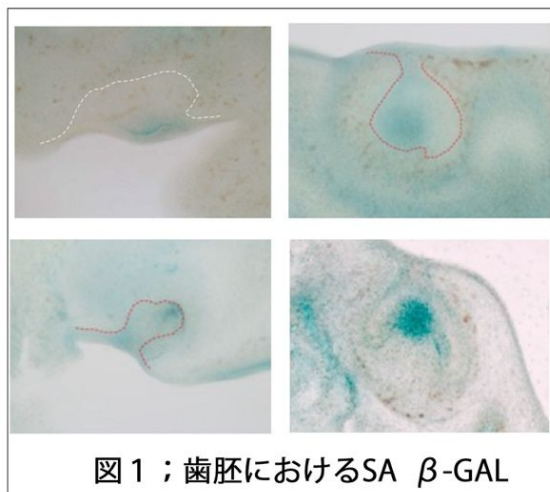


図1 ; 歯胚におけるSA β -GAL

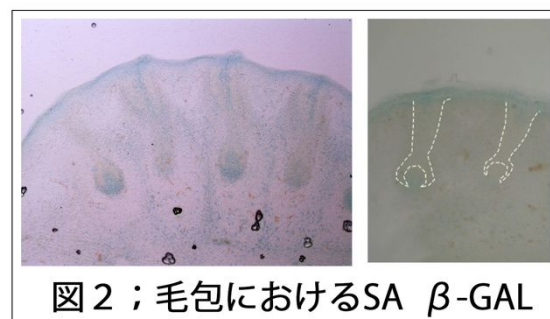


図2 ; 毛包におけるSA β -GAL

に依存しているかを明らかにするために、歯胚と毛髪原器におけるp21とp53の発現を検索した。上皮と間葉の両方で老化シグナルが認められる時期の歯種の歯胚で検索を行った。歯胚上皮

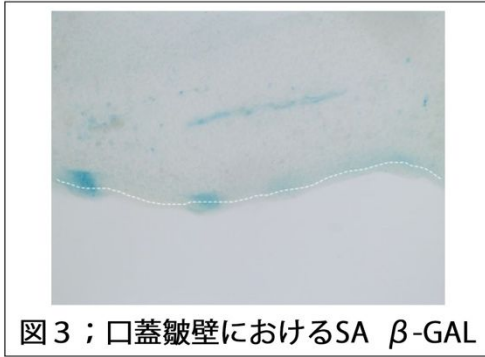


図3；口蓋皺壁におけるSA β-GAL

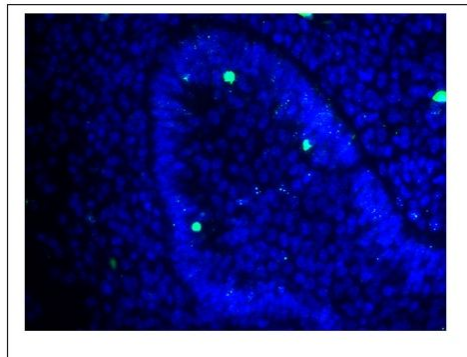


図4；歯胚におけるH3K9me3の発現

では、p21のみを発現する細胞とp21とp53の

両方を発現する細胞を多く認めた(図5)。p53のみを発現する細胞は、上皮ではあまり認められなかった。間葉では、p21のみを発現する細胞は認められたが、p53を発現する細胞は認められなかった(図5)。同様の解析を毛包でも行った。毛包においても、上皮と間葉の両方で老化シグナルが認められる時期の毛包で解析を行った。歯胚と違い、上皮ではp21のみを発現する細胞がほとんどであり、p21とp53の両方を発現する細胞は、わずかに存在するのみであった(図6)。p53のみを発現する細胞は、毛包の上皮でも認められなかった(図6)。間葉では、歯胚と同様にp21のみを発現する細胞が認められた一方、歯胚では認められなかったp21とp53の両方を発現する細胞が認められた。歯胚と同様に、p53のみを発現する細胞は認められなかった(図6)。口蓋突起においても、p21の発現が老化シグナルの部位と一致して認められたものの(図7)、p53の発現は認められなかった。

正常な器官形成過程には、アポトーシスが認められる。そのアポトーシスの発生には、p21とp53が関わることが知られている。p21とp53の両方を発現する細胞の割合と、Caspase3陽性細胞の割合は類似しており(図8)、それらの細胞に認められるp21とp53の発現は、アポトーシスの誘導のためである可能性が考えられた。老化シグナルではアポトーシスは誘導されないため、p21とp53の両方を発現する細胞は、老化シグナルに関連しない可能性が高いと考えられた。

一方、上記の結果は、歯胚、毛包、口蓋皺壁におけるp21のみを発現する細胞は、胎生期の指や腎臓の原器に認められるp21経路による胎生期の老化シグナル活性を誘導することで、歯や毛髪の形成にも関わっている可能性が高いことを示している。そこで、p21が間葉組織でのみ欠損したマウス(p21^{fl/fl};Wnt1Cre)を作成した。しかし、歯髓腔の狭窄が確認されたものの、歯冠形態や体毛等に大きな変化は認められなかった(図9)。

歯胚の上皮でわずかに認められたp53を単独で発現している細胞が、老化シグナルの活

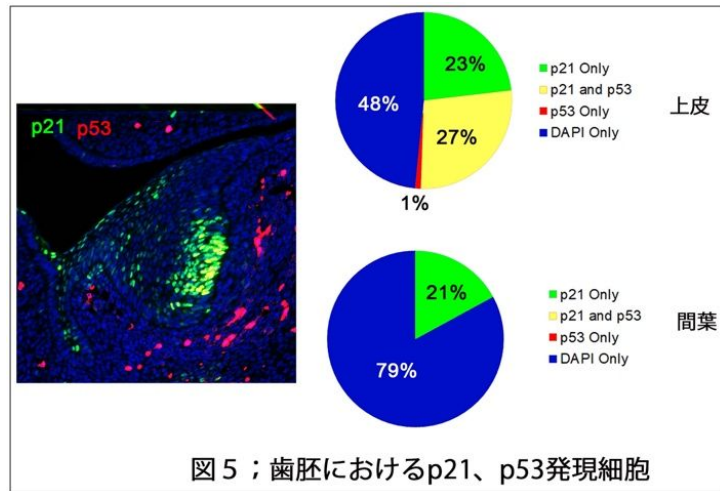


図5；歯胚におけるp21、p53発現細胞

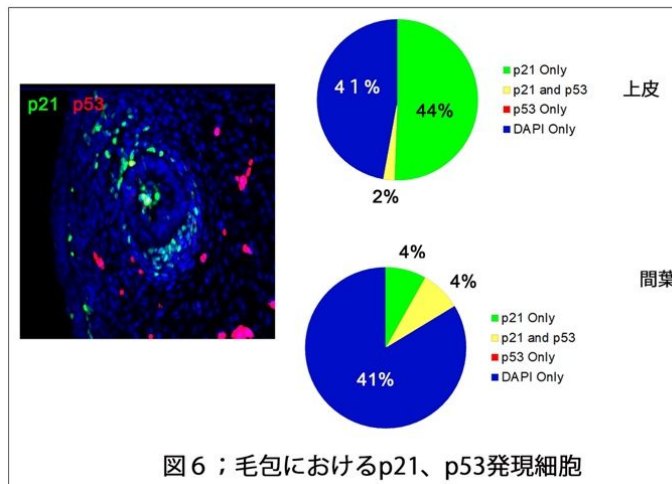


図6；毛包におけるp21、p53発現細胞

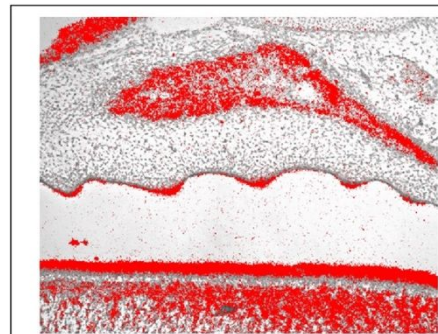


図7；口蓋皺壁におけるp21の発現

性に関連するかを検索するために、p53 と老化関連分子の一つである E2F7 の共発現を検索した。検索した時期の歯胚では、p53 発現細胞数が少なかったものの、p53 発現細胞に E2F7 の発現は認められなかった(図 10)。E2F7 と p53 の共染色において、約 1% の上皮細胞に認められた p53 単独発現細胞が、p21 と p53 の共染色の際に認められた 1% の p53 単独細胞であると考えられた。このように、歯胚の上皮で認められた p53 が単独で発現している細胞と、老化シグナルの活性の関連性は確認されなかった。さらに、p53 欠損マウスの歯や毛髪を確認したが、大きな変化は認められなかった(図 11)。一方で、口蓋皺壁では、p21 欠損マウスに異常は観察できなかったものの、p53 欠損マウスでは、口蓋皺壁の若干の乱れを認めた(図 12)。

p53 と p21 とは別の老化誘導経路として、p16 が存在する。歯胚、毛包においても、ある一定数の p16 発現細胞が確認することができた(図 13)。p21 や p53 の発現頻度と異なっており、上記とは別の老化シグナル誘導経路が存在する可能性が考えられた。

正常マウスの歯胚に酸化ストレスの存在を認めた(図 14)。老化シグナルの誘導の要因の一つである可能性が考えられた。

皮膚の付属器官の発生において、老化シグナルが発現していることが確認された。その発現部位やパターン、その発現強度は、器官間で異なることに加え、同じ器官の中でも、時期により大きく異なっていた。一方で、老化シグナルを誘導する分子が欠損しても、補償システムによって器官形成が正常に進行する可能性が示された。

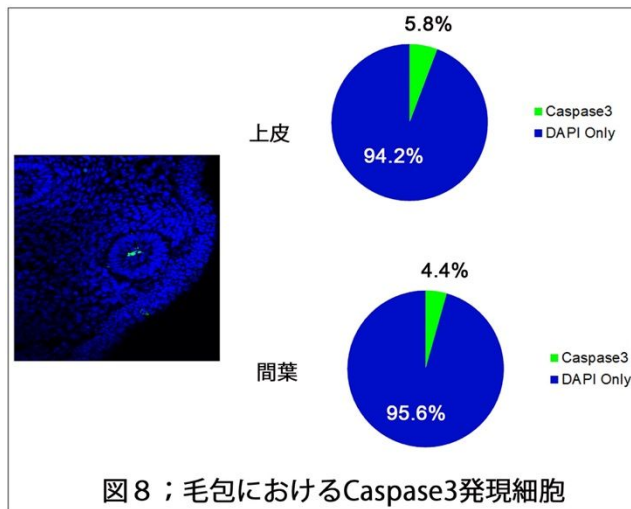


図 8 ; 毛包におけるCaspase3発現細胞

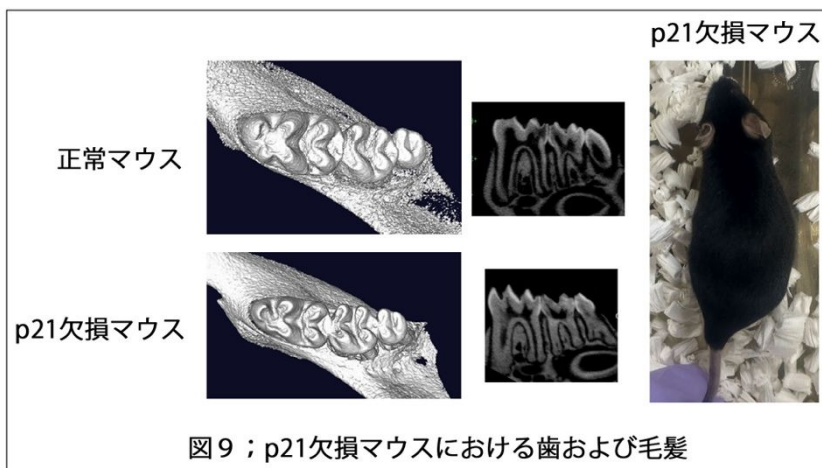


図 9 ; p21欠損マウスにおける歯および毛髪

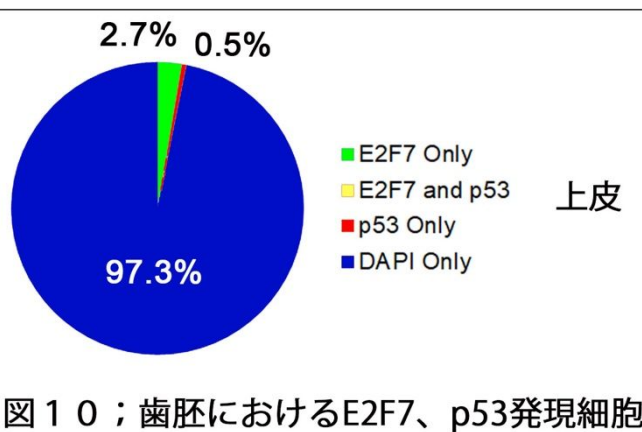


図 10 ; 歯胚におけるE2F7、p53発現細胞

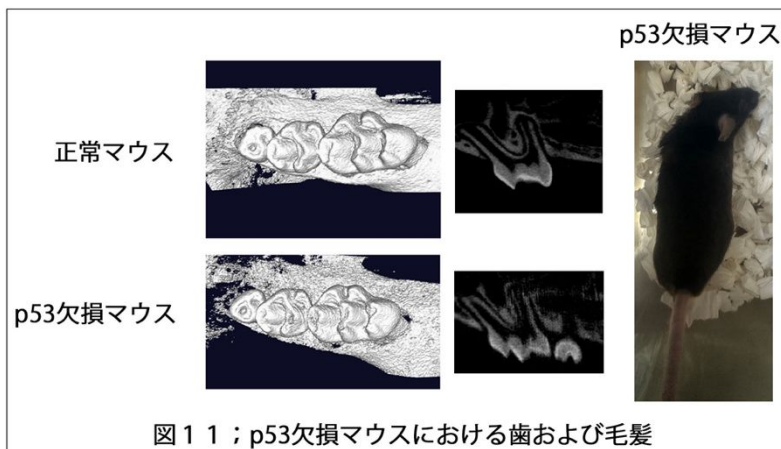
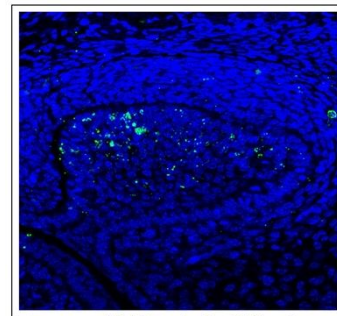
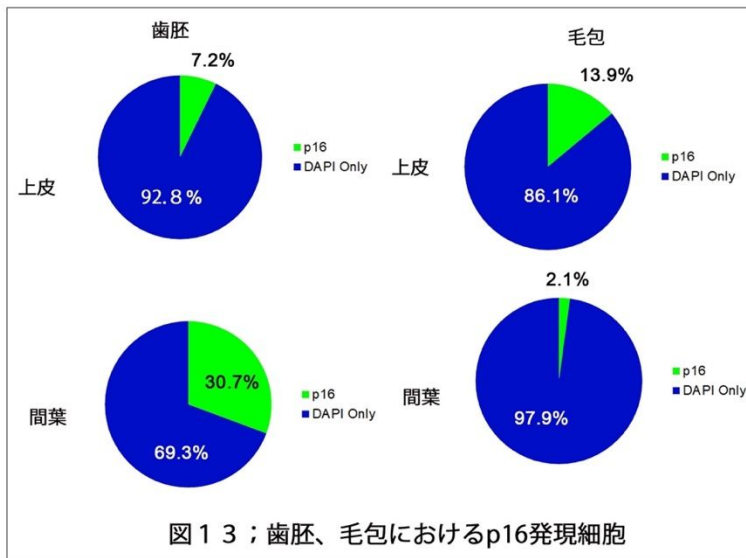
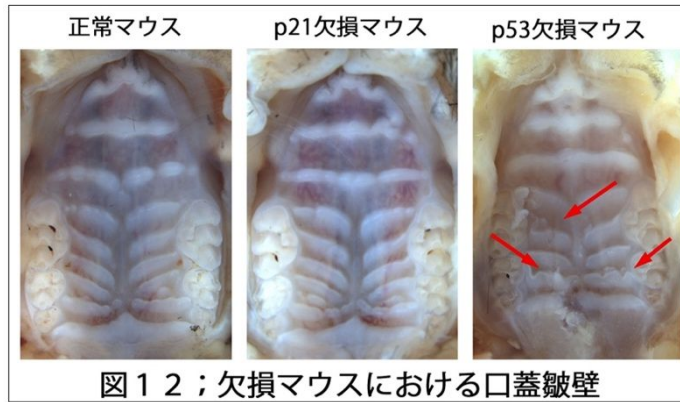


図 11 ; p53欠損マウスにおける歯および毛髪



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大峽 淳
2. 発表標題 MicroRNAは中顔面形成において老化シグナルを抑制している
3. 学会等名 第5回オーラルサイエンス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Finsa Tisna Sari, Vanessa Utama, Katsushige Kawasaki, Maiko Kawasaki, Jun Nihara, Kazuaki Oosawa, Takehisa Kudo, Madoka Kitamura, Takeyasu Maeda, Atsushi Ohazama
2. 発表標題 MicroRNAs inhibit senescence in craniofacial development
3. 学会等名 新潟歯学会. 第2回例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 目黒史也, 川崎勝盛, 川崎真依子, 北村円, Jean Rosenbaum, 大峽淳
2. 発表標題 胎児酸素環境に依存した重層扁平上皮の発生機序
3. 学会等名 第5回口腔医科学フロンティア研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前田 健康 (Maeda Takeyasu) (40183941)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	川崎 真依子 (Kawasaki Maiko) (40584587)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関