

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21004

研究課題名（和文）歯の発生における活性酸素の役割

研究課題名（英文）The role of Reactive Oxygen Species in odontogenesis

研究代表者

工藤 武久（Kudo, Takehisa）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：70909770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：酸素は生命活動を営む上で必須のものである。体内に取り込まれた酸素の一部は、通常よりも活性の高い活性酸素（Reactive Oxygen Species：ROS）となることがある。活性酸素は老化、がん、生活習慣病などの発症に関わる一方、シグナル伝達などの正常な細胞活性の機能にも関与すると考えられており、その全貌は掴めていない。本研究は、歯の発生における活性酸素について検索した。本研究結果から、前歯のENAMEL結節における細胞増殖活性の喪失に、活性酸素が関わっている可能性が示唆された。また、臼歯歯胚に活性酸素が認められず、臼歯歯胚における細胞増殖活性の喪失のメカニズムは前歯と異なる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患の発症誘因因子として知られる活性酸素は、生体の正常機能へも関与することが報告されている。正常機能の多くは生後のものであり、胎児における活性酸素の機能は報告がない。そのような中、歯胚に活性酸素が存在することを示した本研究の意義は大きい。今後、胎児における活性酸素の制御機構や、強弱の有無などを明らかにすることで、先天異常の発症機序に迫れる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Oxygen is essential for our vital activities. Some of the oxygen taken into the body often change to reactive oxygen species (ROS), which obtain more activity than the normal state. Excess ROS are thought to be involved in aging, cancer, and lifestyle-related diseases, while ROS is also related to normal biological events such as signal transduction. However, ROS is not fully understood. This study investigated the ROS in tooth development. The results suggest the possibility that ROS is involved in the loss of cell proliferation in incisor enamel knot. On the other hand, no ROS were observed in molar tooth germs, indicating that the mechanism of loss of cell proliferation in molar is probably different from that in incisor.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：歯の発生 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

我々は、生命活動を営む上で酸素を利用する。体内に取り込まれた酸素の一部は、通常の状態よりも反応性の高い活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) となることがある。この活性酸素は、DNA 損傷、蛋白質の変性、各種酵素の機能失活などをもたらすが、それらの障害の多くは各種の修復機構により修復される。活性酸化による酸化そのものも、抗酸化機構によって抑制されている。しかし、抗酸化機構や修復機構の能力を超えた過剰な量の活性酸素が発生した場合、それらの過剰な活性酸素によって老化、がん、糖尿病、高血圧などの多くの疾病が誘発されると考えられている。一方で、活性酸素は負の要素だけではなく、その強い酸化力により、細菌などへの免疫反応にも利用されるとの報告がある。さらに、活性酸素は細胞間のシグナル伝達、細胞の分化などの生理活性物質として機能するとの報告もあるなど、活性酸素の全貌は掴めていない。

2. 研究の目的

本研究は、歯の発生における活性酸素について検索することを目的とする。

3. 研究の方法

野生型マウスを用いて、歯の発生における活性酸素について検索した。

4. 研究成果

通常の発生学研究では、マウスの胎仔の取り出しの時期は、Verginal plugの有無をもとに決定している。しかし、それでは歯の発生の時期にばらつきが生じる。たとえば、同じ胎生 13 日でも、蕾状期から帽状期前期まで、胎仔によってステージが異なる (図 1)。一方、胎仔の重さと歯の発生の時期には相関がある事が報告されている (Peterkova et al., Int. J. Dev. Biol. 39: 239-247, 1995)。そこで、実際に胎生 12 日、胎生 13 日、胎生 14 日の胎仔で、歯胚の形成時期を体重別に確認したところ、歯の発生ステージが一定することが確認できた。そこで本研究では、Verginal plug 有無に、体重の測定を併用することで、歯の発生の時期のばらつきを抑えることとした。体重は、胎仔を取り出し、体表

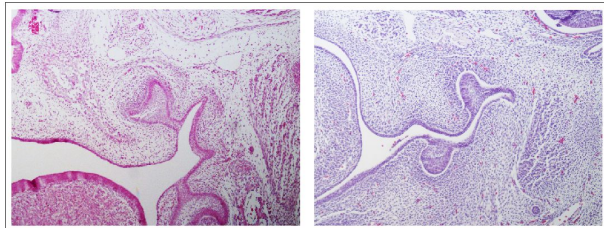


図 1 ; 胎生13日

図 2 ; 胎生 1 3 日 (体重別 ; 背部)

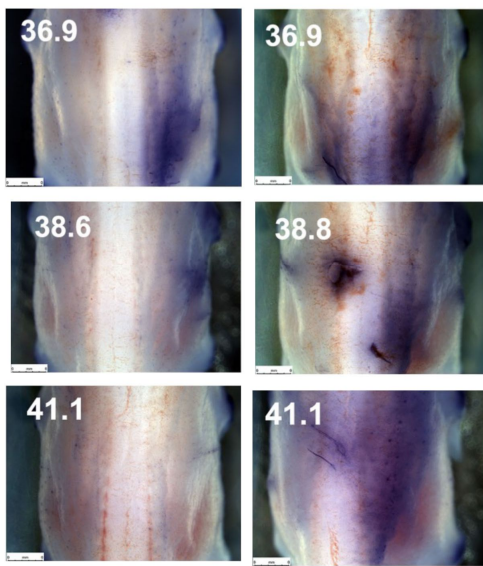
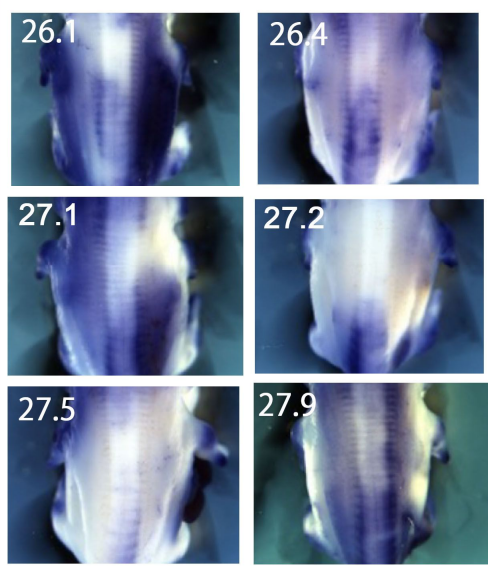


図 3 ; 胎生 1 2 日 (体重別 ; 背部)



面の水分を取り除いた後に測定した。

初めに Verginal plug 有無と体重によって分類した野生型マウスの胎生 1 3 日の胎仔を使用して、NBT 染色による活性酸素の有無を確認した。全身で確認したところ、活性酸素の存在が確認できた。しかし、ほぼ同じ体重であっても陽性部位の分布や大きさが大きく異なっていた (図 2)。胎生 1 2 日の胎仔でも同様であった (図 3)。意図的に体表面を傷つけると、損傷部位が強く陽性となることが明らかとなり、重さ測定の際に器具が胎仔に触れた部位が、活性酸素の偽陽性を示すことが判明した。口腔内は、

NBT による染色の際の溶液の到達性が悪く、染色の際には下顎を頭部から外して染色する必要がある。しかし、それでは歯胚領域に染色中に器具や瓶の内面が触れることで偽陽性になる可能性がある。そこで、顔面を矢状面断で片側 1 /

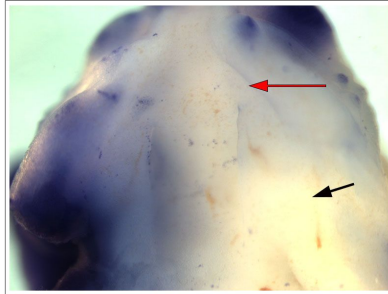


図 4 ; 胎生12日
赤矢印 ; 前歯部領域
黒矢印 ; 臼歯部領域

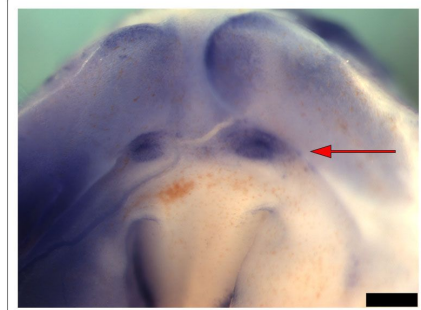


図 5 ; 胎生13日
赤矢印 ; 前歯部領域

3 を除去し、それ以外の部位は上下顎を分離せずに intact な状態にしたのちに、染色することとした。口腔内が外側に露出するために、残存した顔面側に溶液は容易に浸透する一方、歯胚は外側に露出していないため、器具や瓶内面と接触することはない。これにより、溶液の浸透不足による偽陰性、器具や瓶内面との接触による偽陽性を回避できる。

胎生 12 日と 13 日の胎仔において、臼歯歯胚に活性酸素は認められなかった。胎生 12 日の前歯にも活性酸素は認められなかった (図 4)。一方、胎生 13 日の前歯には活性酸素が認められた (図 5)。胎生 14 日でも同様の結果が得られた。胎生 13 日の前歯の活性酸素活性部位を

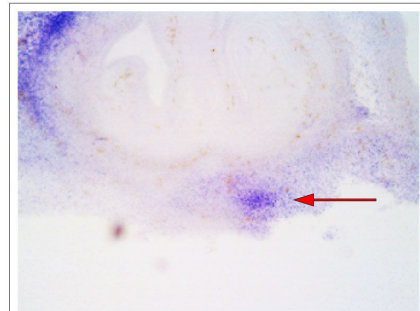


図 6 ; 胎生 13 日

vibratome 切片で確認したところ、活性酸素は上皮全体ではなく、エナメル結節に相当する部位に限局して活性化しているのが確認された (図 6)。

エナメル結節の上皮細胞は、他の歯胚上皮細胞と異なり、細胞増殖活性が停止している。胎生 12 日では全ての歯胚上皮細胞が細胞増殖活性を示しており、胎生 12 日から胎生 13 日にかけて、エナメル結節の上皮細胞は細胞増殖活性を失うことになるが、そのメカニズムは明らかでなかった。本研究結果から、エナメル結節における細胞増殖活性の喪失に活性酸素が関わっている可能性が示唆された。また、臼歯歯胚に活性酸素が認められなかったことから、臼歯歯胚にもエナメル結節は存在するが、臼歯歯胚における細胞増殖活性の喪失のメカニズムは、前歯のものと異なる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------