

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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592031

研究課題名（和文） TDL培養を用いた歯冠凹凸形成のメカニズム研究

研究課題名（英文） A study of concavo-convex formation mechanism in occlusal surface by using of TDL culture.

研究代表者

田畑 純（TABATA MAKOTO）

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、申請者らが開発したTDL培養（Three Dimensional & Layered culture）法とビーズ法を組み合わせ、咬合面の凹凸形成のメカニズムを検証する予定であったが、初代培養細胞の組み合わせのため、作業が複雑になり、十分なデータ数をとるのが困難になってきた。そこで、手法の改善が必要となり、①株細胞の導入、②TDL培養の組み合わせ方の改良、③新しい検出方法の開発、などを試した。そして、興味深い性質を示す株細胞を見いだすことができ、いくつかの新しい手法を開発できた。

研究成果の概要（英文）：

Initially, we had a plan in which we use the combination of TDL (Three dimensional & layered) culture method and soaked-beads method for the study of concavo-convex formation mechanism in occlusal surface. However, the protocol became complexity for the usage of primary cells, and we could not easy to obtain enough sample. So, we tried to improve methods as follows, 1. Usage of cell-lines, 2. Turnaround of TDL method, 3. Development of new method of analysis. As a result, we found a cell-line showing interesting character, and several new methods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の歯は、切歯、犬歯、小白歯、大白歯の4群に分けられ(ヒト永久歯の場合)、それぞれの**歯種に固有の形態**がある。とりわけ**咬合面の変化は大きくかつ精緻**である。しかし、歯胚の発生過程を見ると、**形成に関わる細胞の種類は同じであるし、分化様式や基質形成様式にも大きな差はない**。それでも、**鐘状期以降には形態の差が顕著**になり、例えば、切歯歯胚や犬歯歯胚であれば切縁形状が顕著になってくるし、臼歯歯胚では咬頭が複数現れ、溝の形も顕著になってくる。歯冠形成の研究に於いては、「咬頭の数と位置が最初に決まるべきものなのか、それとも溝の位置決めが優先されるのか」という課題や、「それらの決定因子はなにか」という問題も重要である。しかし、**形状の違いを生む具体的な要因の追求**は、これまであまりなされていなかった。では、実際に形状の違いを生む要因は何だろうか？ どのような手順によるのだろうか？

鐘状期歯胚を見るとエナメル器と歯乳頭の境界面に向かって、前者からエナメル質、後者から象牙質が分泌されだんだんと歯冠が作られていく。すなわち、この境界面こそが将来のエナメル象牙境であって、将来の歯冠形態を概ね定めていると言ってよいだろう。そして、この**境界面の形を曲げたりまっすぐにしたりする要因は何か**という、それは両面に並ぶ**歯胚上皮と歯胚間葉の細胞増殖のバランス制御**であった (Tabata et al. *Development* 1996)。

このことから、**上皮側の細胞数が多くなれば咬頭などの凸部を作り(図1)、間葉側の細胞数が多くなれば溝などの凹部を作り(図2)、結果として咬合面の凹凸形成がなされる**という考えが提唱された(田畑・近藤、人類学会誌

2006)。これは部品の形は同じでも数や組み合わせ方を変えて複雑な形を作るレンガ建築になぞらえるとわかりやすい。また、多くの増殖因子が上皮もしくは間葉の一方にのみ効果を持つものが多いことからこの考えを支持できるし、こうした増殖制御箇所が複数現れることがあれば、複数の咬頭や溝を持つ咬合面が形成されるはずである。しかし、実際の検証には**上皮と間葉を個別に操作できる適切な *in vitro* 実験系が無かったため、これまで検証できずにいた**。

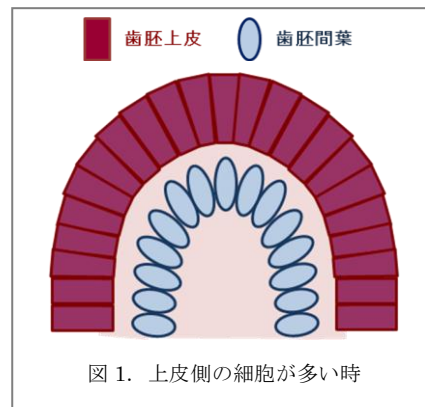


図1. 上皮側の細胞が多い時

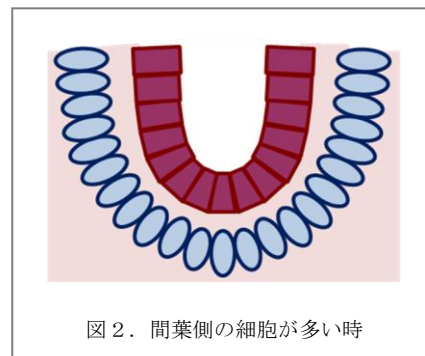


図2. 間葉側の細胞が多い時

2. 研究の目的

歯は歯種ごとに固有の形態があつて、咬合や咀嚼において重要であり、遺伝的に決定されているが、歯胚の細胞による形づくりの実態は未だに不明の点が多い。本研究では、申請者らが開発した**TDL培養(Three Dimensional & Layered culture)法とピース法**

を組み合わせることで歯胚の上皮細胞と間葉細胞を個別に操作し、**細胞増殖や分化を局所的に促進または停止させて、咬合面の凹凸形成のメカニズムを検証することにした。**

3. 研究の方法

申請者らが開発した**TDL培養**(歯胚の上皮細胞と間葉細胞の共培養系)と**ビーズ法**(増殖因子、阻害因子、アンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチドなどを含浸)を組み合わせることで実験する。これにより、上皮または間葉に**埋め込んだビーズからさまざまな因子を徐放でき**、増殖因子の局所的な濃度変化、阻害因子やアンチセンスによる局所的な機能阻害を人為的に起こすことができる。結果としては、適切な因子を使用した際に、**咬頭や溝のような凹凸構造が形成される**ことが期待され、通法による細胞増殖・分化の解析、動態観察、組織標本観察、抗体染色、*in situ* ハイブリダイゼーションなどにより、関連因子の増減や遺伝子発現の変化も検証される。

TDL培養法

生後 7-10 日齢ラットの下顎切歯／臼歯歯胚から、顕微鏡下で歯胚を構成する上皮と間葉(歯髄)を取り出し、細切の後、酵素処理によって**歯胚上皮細胞と歯髄細胞を単離・分散させて培養**に用いる(野谷ら、JADR 2008; 田畑ら、解剖学会 2009; 野谷ら、歯科基礎医学会 2009; Notani et al.,)。

ビーズ法

目的とする増殖因子や増殖因子阻害剤、アンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN)を PBS に溶解し、**アガロース・ビーズ**に含浸させて(Thesleff 1993 など)、TDL

外植体への埋め込みに用いる。

4. 研究成果

[平成 22 年度]

TDL培養のパーツとなる上皮成分の摘出・調整法の改善に大きな成果があった。この改善によって、新しい手法が構築できる見通しができ、急遽、その確立に時間を割いた。このため、計画調書の案とは異なる進行となったが、ほぼ実用段階まで到達した。また、培養下における細胞マーカーの不足があったため、マーカー発現の精密な比較研究を行った(解剖学会2011)。

この他、関連成果として、象牙芽細胞のFGFR発現(歯科基礎医学会2010)、星状網細胞を除去した歯胚の発生(JADR 2010)が得られた。

[平成 23 年度]

当初の方法では、初代培養細胞を2種類用意して、共培養を行うため、毎回20匹分のラットの切歯、臼歯を材料に実験を開始する。この頭数は一日の実験数としては上限数であるが、実験を行うには十分とはいえず、実験の効率をなかなかあげられずにいた。くわえて、複数の細胞がまざっていることも問題で、詳細な解析によってこれら混入細胞を識別できるものの、誘導実験においては無視できない障害となってきた。

そこで、初代培養から株細胞に切り換えて、全体の効率を上げることにした。もともと好適と思われる株細胞を探し、23年秋に歯胚間葉(仮称A株)、24年3月に歯胚上皮の株細胞(仮称B株)を入手した。いずれも、まず単層培養によって増殖や分化の特性を発現蛋白質やタイムラプス観察などによって検証した。

この他、関連研究として、外エナメル上皮、星状網細胞を除去した歯胚の in vitro での発生を発表した(歯科基礎医学会 2011)。

[平成 24 年度]

前年度に引き続き、株細胞の検討として、象牙芽細胞の株細胞(仮称 C 株)を得てその性質を検証した。その結果、前年度の象牙芽細胞株(A 株)とは異なる性質を持つことが判明し、使い分けの必要も出てきた。

次に、これらの株細胞を用いた TDL 培養を試すことにした。単独での TDL 培養への使用、上皮・間葉での組み合わせの使用などを順次行っており、現在も継続中である。

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 3 件)

1. Ahmad M, Iseki H, Abduweli D, Baba O, Tabata MJ, Takano Y: Ultrastructural and histochemical evaluation of appositional mineralization of circumpulpal dentin at the crown- and root-analog portions of rat incisors. *J. Electron Microscopy*, 60, 79-87 (2010) 2011年2月 査読あり
2. Atukorala AD, Inohaya K, Baba O, Tabata MJ, Ratnayake RA, Abduweli D, Kasugai S, Mitani H, Takano Y: Scale and tooth phenotypes in medaka with a mutated ectodysplasin-A receptor: implications for the evolutionary origin of oral and pharyngeal teeth. *Arch Histol Cytol*. 2010;73(3): 139-48. 査読あり
3. Suzuki N, Danks JA, Maruyama Y, Ikegame M, Sasayama Y, Hattori A, Nakamura M, Tabata MJ, Yamamoto T, Furuya R, Saijoh K, Mishima H, Srivastav AK, Furusawa Y, Kondo T, Tabuchi Y, Takasaki I, Chowdhury VS, Hayakawa K, Martin TJ.: Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. *Bone*. 2011 May 1;48(5):

1186-93. 査読あり

[学会発表] (計 19 件)

1. 田畑純: 初代培養とTDL培養を用いた歯胚上皮細胞の分化機構の解析:よく動き、形を変える細胞たち. 第42回日本臨床分子形態学会総会・学術大会・ワークショップ(三島・東レ総合研修センター)2010年9月
2. 田畑 純: 硬組織の多様性と共通性: シーラカンスとキンギョのウロコの組織解析. 第53回歯科基礎医学会・サテライトシンポジウム10(岐阜市)2011年9月
3. 池亀美華、服部淳彦、丸山雄介、北村敬一郎、田畑 純、井関八郎、矢野幸子、田淵圭章、山本敏男、鈴木信雄: 微小重力に対するウロコの破骨細胞の応答: 国際宇宙ステーションにおける宇宙実験. 第53回歯科基礎医学会・サテライトシンポジウム10(岐阜市)2011年9月
4. Tabata MJ, Nishii N, Iseki H, Baba O, Takano Y: Development of mouse tooth germ without outer enamel epithelium. *58th General Session of the JADR, (Kokura)* Nov, 2010
5. Mishima H, Hattori A, Suzuki N, Tabata MJ, Kakei M, Miake Y, Suzuki M: The connection between the periodicity of incremental lines in the tooth dentin and the regulation by melatonin. *European Calcified Tissue Society 39th meeting (Stockholm)* May, 2012
6. 馬場麻人、寺島達夫、太田正人、田畑純、高野吉郎: 象牙芽細胞におけるFGFRの発現. 第52回歯科基礎医学会(東京)2010年9月
7. 矢野幸子、笠原春夫、吉馴重徳、田畑 純、服部淳彦、鈴木信雄: 宇宙空間における骨代謝制御: キンギョの培養ウロコを骨のモデルとした解析 (Fish Scales) - 冷蔵輸送の検討. 第24回日本宇宙生物科学会(東北大学)2010年9月
8. 田畑 純、馬場優里、石山巳喜夫、奈良雅之、岡田典弘、高野吉郎: シーラカンス・ウロコの小歯様突起の解析. 第5回バイオミネラルリゼーション・ワークショップ(東京大学)2010年11月
9. Naoto NISHII, Hachiro ISEKI, Yoshiro TAKANO and Makoto J. TABATA: Is outer enamel epithelium necessary for the development of mouse tooth germs? (マウス歯胚の発生に外エナメル上皮は必要か?)

- 第88回日本生理学会・第116回日本解剖学会・全国学術集会 合同大会(パシフィコ横浜)2011年3月
10. Takafumi NAKANO, Hachiro ISEKI, Otto BABA, Yoshiro TAKANO and Makoto J. TABATA: Cell identification study of dental epithelium of rat incisor. (ラット切歯の歯胚上皮の構成細胞の識別研究) 第88回日本生理学会・第116回日本解剖学会・全国学術集会 合同大会(パシフィコ横浜)2011年3月
 11. Yuri BABA, Hachiro ISEKI, Masayuki NARA, Mikio ISHIYAMA, Norihiro OKADA, Yoshiro TAKANO and Makoto J. TABATA: Morphological study of the denticles on the fish scales of Coelacanth Latimeria culumnae. (シーラカンスのウロコ上にあるデンティクルの形態学的研究) 第88回日本生理学会・第116回日本解剖学会・全国学術集会 合同大会(パシフィコ横浜)2011年3月
 12. Ayaka YANAGI, Hachiro ISEKI, Yoshiro TAKANO, Atsuhiko HATTORI and Makoto J. TABATA: In vitro study of regeneration mechanism of fish scales of goldfish. (キンギョ・ウロコの再生メカニズムの in vitro 研究) 第88回日本生理学会・第116回日本解剖学会・全国学術集会 合同大会(パシフィコ横浜)2011年3月
 13. 池亀美華、服部淳彦、北村敬一郎、田畑純、矢野幸子、山本敏男、鈴木信雄: キンギョのウロコに存在する破骨細胞は微小重力下で活性化する。第29回骨代謝学会(大阪)2011年7月
 14. 鈴木信雄、池亀美華、田畑純、北村敬一郎、矢野幸子、山本敏男、服部淳彦: 宇宙におけるウロコの破骨細胞の形態及び細胞活性の変化。日本動物学会・中部支部例会(福井大学)2011年7月
 15. 田畑純、井関八郎、馬場麻人、高野吉郎: 外エナメル上皮除去歯胚の培養下における発生。第53回歯科基礎医学会(岐阜市)2011年9月
 16. 田畑純、井関八郎、池亀美華、宮下桂子、丸山雄介、大森克徳、遠藤雅人、馬場麻人、服部淳彦、鈴木信雄: キンギョ・ウロコを使った宇宙実験: 微小重力下における破骨細胞の超微細構造解析。第116回日本解剖学会・全国学術集会(甲府市)2012年3月
 17. Otto Baba, ADSL Atukorala, Keiji Inohaya, Makoto Tabata, Kiyoshi Mitani, Yoshiro Takano: Differential effect of aberrant expression of ectodysplasin-A receptor (edar) on scales and jaw and pharyngeal

dentition of medaka. 第116回日本解剖学会・全国学術集会(甲府市)2012年3月

18. 三島弘幸、井上昌子、服部淳彦、鈴木信雄、田畑純、寛光夫、松本敬、里村一人、見明康雄: 象牙質の成長線の周期とメラトニンの分泌リズムの関連。第7回バイオミネラルゼーションワークショップ(東京大学)2012年12月
19. 三島弘幸、井上昌子、服部淳彦、鈴木信雄、田畑純、寛光夫、松本敬、里村一人、見明康雄: 象牙質の成長線形成機構と体内時計の情報伝達分子であるメラトニンの分泌リズムの関係。第117回日本解剖学会・全国学術集会(高松市)2013年3月

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 純 (TABATA MAKOTO)
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

(2) 研究分担者

高野吉郎 (TAKANO YOSHIRO)
東京医科歯科大学・
大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 90126425

(3) 連携研究者

鈴木信雄 (SUZUKI NOBUO)

金沢大学・

自然計測応用研究センター・准教授

研究者番号：60242476