

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861999

研究課題名(和文) マイクロアレイの網羅的遺伝子情報に基づく IGF-1 による歯の形態制御機構の解析

研究課題名(英文) Microarray-based analyses of the mechanisms of tooth morphogenesis regulated by IGF-1

研究代表者

千田 透子 (Chida, Toko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40647947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、IGF-1による歯の形態制御機構を解明するため、マイクロアレイにより IGF-1が発現を変動させる因子の同定を行った。さらに、歯の発生過程において IGF-1が歯性間葉細胞に及ぼす影響を解析するために、マウス歯胚から単離した歯性間葉細胞を用いて培養実験を行った。その結果、IGF-1は歯の発生を制御する因子の発現を亢進し、また、歯性間葉細胞の増殖と分化を亢進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We identified the molecules which are regulated by IGF-1 with microarray analysis to clarify the mechanisms of tooth morphogenesis regulated by IGF-1. As a result, IGF-1 upregulated expressions of various molecules that modulate tooth development. Moreover, we performed in vivo study to analyze the effects of IGF-1 on mice dental mesenchymal cells. IGF-1 induced proliferation and differentiation of dental mesenchymal cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医療 IGF-1 歯の形態

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療の研究が盛んに行われている中、歯科領域においても失われた歯の再生における研究も著しく行われている。多数歯にわたる先天性欠如の起こる頻度は約 7~8%であり、これまで、矯正歯の移動による欠損部の空隙閉鎖や人工的な補綴物での処置が行われてきた。歯の先天性欠如に対する治療の重要性が着目され、2012年に6歯以上の非症候性部分無歯症の矯正歯科治療は保険適用となった。将来的に、「歯の再生」の実用化が可能になった場合、治療の選択肢は増え、国民の歯科医療において有益であると考えられる。

申請者の所属するグループは、インスリン受容体の変異が原因の疾患である妖精症の患者において、insulin like growth factor I (IGF-I)を長期投与されていた歯の歯冠幅径が著しく大きく、そのため重度の叢生が認められることを報告した (Fukunaga et al, Angle Orthod, 2007)。この知見から、歯の発生を調節する因子のうち、IGF-Iが歯の大きさを制御する働きを担っていると推論した。そこで、マウス人工歯胚から発生した再生歯の大きさを、IGF-Iにより制御できるか解析した結果、IGF-Iによる再生歯のサイズの増大が明らかとなった。以上のことから、再生歯の大きさを制御するうえでIGF-Iは有用であることが示されたが、IGF-Iによる歯胚形態制御における分子生物学的制御メカニズムは、ほとんど明らかではない。

また、歯の発生過程において、上皮・間葉組織間での様々な情報伝達は、細胞の増殖や分化を時間・空間的に制御することにより、正常な歯の発生を誘導する。この上皮・間葉相互作用には、BMP4-Msx1-LEF1、FGF4-Msx1など多数のシグナル伝達経路が存在する。さらに近年 Wnt-Bmp フィードバック経路が歯の器官形成における相互的なシグナル伝達分子のダイナミクスを制御す

る重要な経路であると報告され (Daniel J, Sci Signal, 2012)、歯の発生で認められる上皮・間葉相互作用におけるシグナル伝達経路の解明が進んできた。しかしこれまでの報告は、シグナル伝達経路の断片的な解析しか成されていない。

2. 研究の目的

本研究では、IGF-Iを応用した再生歯の形態制御方法の確立を目指し、歯の発生過程においてIGF-Iシグナルが歯胚形態におよぼす影響を遺伝子発現レベルで網羅的に解析するために、マイクロアレイによるデータマイニングを応用することとした。これにより、IGF-Iによる形態制御を受けた歯胚における、IGF-I下流遺伝子の同定を目指した。さらに、IGF-Iの歯胚間葉細胞の増殖および分化に及ぼす影響を調べることにした。

3. 研究の方法

(1) 歯胚上皮および間葉組織におけるマイクロアレイを用いたIGF-I下流遺伝子の同定

胎生 14.5日のマウス下顎臼歯歯胚を摘出し、IGF-I添加、非添加下にて器官培養を行った。培養後、Dispase処理により上皮組織と間葉組織に分離した。得られた組織のRNA精製を行い、マイクロアレイの試料とした。

(2) IGF-Iが歯胚間葉細胞の増殖に及ぼす影響の解析

胎齢 14.5日マウスの下顎臼歯歯胚から間葉細胞を単離し、10% FBSを添加したDMEM培地にて培養した。サブコンフルエントに達した時点で細胞を0.05% trypsin/EDTAにより回収した。得られた細胞を96well plateに播種し、10% FBSを添加したDMEMを用いて培養を行った。翌日から、0, 10, 100, 500ng/mlのIGF-Iを添加し、Cell counting kit-8 (WST8; DOJINDO,

Kumamoto, Japan)を用いて、添付のプロコールに従って、培養 1 から 6 日目の増殖能を毎日測定した。

(3) IGF-I が歯胚間葉細胞の分化に及ぼす影響の解析

胎生 14.5 日のマウス下顎臼歯歯胚を摘出後、上皮および間葉組織に分離した。酵素処理を行い単離した歯胚間葉細胞を IGF-I 添加、非添加下にて 7 および 14 日培養した。トータル RNA を抽出後、精製を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を、real-time PCR の試料として用い、象牙芽細胞分化マーカーとして知られている Dmp1 の発現パターンを解析した。

(4) IGF-I が再構成歯胚における Dmp1 発現に及ぼす影響の解析

胎生 14.5 日のマウス下顎臼歯歯胚を摘出後、上皮および間葉組織に分離し、酵素処理により各々組織を細胞へ単一化した。単一化細胞は遠心部分離後に上清を除去し、I 型コラーゲンゲルにハミルトンシリンジを用いて各々の高密度細胞間懸濁液を互いに接合させるように注入し、再生歯胚を作製した。IGF-I 添加、非添加ゲルを用い、14 日器官培養を行った。培養した再構成歯胚は、HE 染色および Dmp1 免疫組織学染色解析を行った。

4. 研究成果

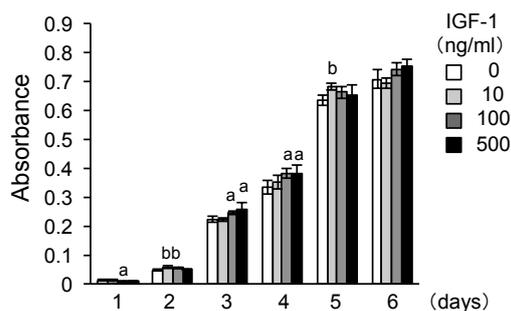
(1) 歯胚上皮および間葉組織におけるマイクロアレイを用いた IGF-I 下流遺伝子の同定

対照群と比較して、IGF-I 添加によって 2 倍以上発現が上昇した遺伝子は、上皮組織においては 38 個、間葉組織においては 81 個認められた。これらの解析によって、IGF-I による歯の発生に関わるシグナルの亢進が示唆された。

(2) IGF-I が間葉細胞の増殖に及ぼす影響の解析

歯胚由来間葉細胞は、培養 2 から 5 日目にかけて活発な増殖を示し、5 から 6 日目にかけてプラトーに達した。特に活発な増殖が認められた培養 3、4 日目においては、IGF-I の濃度依存的な増殖の亢進が認められ、100 および 500ng/ml において、対照群と比較し有意に増殖が亢進した。

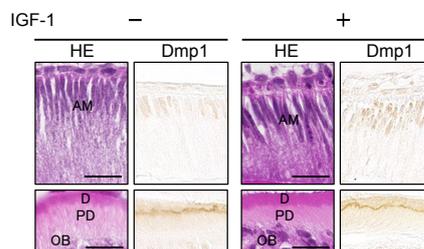
したがって、IGF-I は増殖期にある歯胚間葉細胞の増殖を亢進させることで、歯の形態を制御する役割を担うことが示唆された。

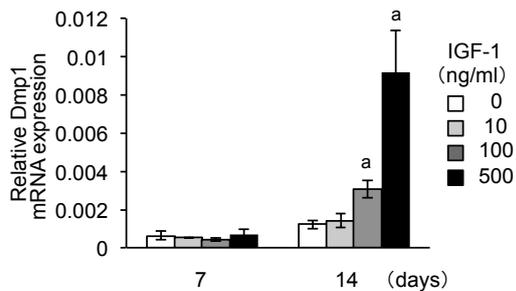


(3) IGF-I が歯胚間葉細胞の象牙芽細胞分化に及ぼす影響

象牙芽細胞分化マーカーである Dmp1 の発現は、培養 7 日目において、IGF-I により影響を受けなかった。しかし、14 日目には、IGF-I の濃度依存的な Dmp1 の亢進が認められ、100 および 500 ng/ml では有意な上昇を示した。これらの結果より、*in vitro* において IGF-1 が天然歯の発生過程において象牙芽細胞分化を促したことが示唆された。

また、IGF-I による再構成歯胚の免疫組織学的解析の結果、Dmp1 は IGF-I 添加、非添加群ともにエナメル芽細胞層および象牙質と前象牙質の接合部位に発現が認められた。





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. Matsui H, Fukuno N, Kanda Y, Kantoh Y, Chida T, Nagaura Y, Suzuki O, Nishitoh H, Takeda K, Ichijo H, Sawada Y, Sasaki K, Kobayashi T, Tamura S. The expression of Fn14 via mechanical stress-activated JNK contributes to apoptosis induction in osteoblasts. *J Biol Chem*, 査読有, 2014, 289 (10) 6438-50
2. Chida T, Ando M, Matsui T, Masu Y, Nagaura Y, Takano-Yamamoto T, Tamura S, Kobayashi T. N-myristoylation is essential for protein phosphatases PPM1A and PPM1B to dephosphorylate their physiological substrates in cells. *Biochem J*, 査読有, 2013, 449(3) 741-9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千田 透子 (Chida, Toko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40647947