

令和元年6月21日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26462800

研究課題名(和文) 歯髄血管新生過程におけるTPO/MPLシグナル制御機構の時空的解析

研究課題名(英文) Analysis of the space-time of the TPO/MPL signal control structure in the pulpal vascularization process

研究代表者

春原 正隆 (Sunohara, Masataka)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：70287770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生過程において内皮細胞および壁細胞の分化・成熟が時間的・空間的に制御されると考えられており、血小板造血機構が血管新生に関与しているとの報告もある。in situ hybridization法を用いた解析により、E14.5～E17.5日齢マウス胎児のエナメル器、歯乳頭、歯胚周辺部間葉細胞において時期特異的・部位特異的にangiopoietin1, angiopoietin2, Tie-2, Vegf-R2, c-mpl遺伝子の強い発現が認められ、これらの遺伝子が歯胚領域血管新生過程における血管内皮細胞・壁細胞間相互作用に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は歯髄幹細胞および幹細胞ニッチ相互間における時空間的(spatiotemporal)なWntシグナル制御機構の解明を基盤とし、TPO/MPLシグナル、NotchシグナルおよびAng1/Tie2シグナルとの相互作用の分子機構を明らかにすることにより、歯髄再生の臨床応用の可能性を詳細に検討することを目的とし、本研究により得られた知見は、歯髄における高次血管構築制御機構の解明、さらにはニッチシグナルを制御することによる歯髄再生医療の基盤の確立、他の生体各組織の高次構造および機能維持機構の解析への多大な貢献が期待できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In angiogenesis, differentiation and maturation of endothelial cells are considered to be stage-specifically and spatio-temporally controlled and also it has been reported that platelet hematopoiesis is involved in angiogenesis. By using in situ hybridization technique, stage specific expression of angiopoietin1, angiopoietin2, Tie-2, Vegf-R2 and c-mpl genes were observed in enamel organ, tooth papilla, tooth germ peripheral region in mouse embryos at days 14.5 post-coitum (p.c.) to p.c. 17.5. The stage-specific these genes have been detected and expression patterns of them suggested that there are some mechanisms contribute to neovascularization during tooth germ development.

研究分野：口腔解剖学・細胞生物学・血液学

キーワード：dental pulp angiogenesis vasculogenesis tooth germ in situ hybridization

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体各組織における「幹細胞」および幹細胞を取り巻く微小環境である「幹細胞ニッチ」における分化制御機構解明に関する研究が、再生医療の確立に向け脚光を浴びている。近年、骨髄における造血系幹細胞のニッチとして内骨膜領域の骨芽細胞性ニッチと類洞血管領域の血管性ニッチの2種類が同定され、造血幹細胞制御の分子メカニズムが明らかになった。歯科領域においては、歯の再生を目指した数多くの研究が行われているものの、歯胚の発生制御機構を解明するには至っていない。歯胚の発生には「幹細胞」、「増殖・分化制御因子」、「足場」の相互作用が不可欠であるため、上記各要素を明らかにするとともに、各要素間相互作用のメカニズムを解明することが歯の再生医療実現に向け急務であると考えられる。近年、多様な分化能を有する歯髄幹細胞の存在が報告されており、歯髄幹細胞の未分化性を維持する際の幹細胞および幹細胞ニッチ相互作用における分化制御機構の解明は、歯髄再生医療具現化の基盤となる重要な情報を提供するものと考えられる。

また、本研究により得られた知見は、歯髄における高次血管構築制御機構の解明、さらにはニッチシグナルを制御することによる歯髄再生医療の基盤の確立、他の生体各組織の高次構造および機能維持機構の解析への多大な貢献が期待できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究により歯髄幹細胞および幹細胞ニッチ相互作用における時空間的(spatiotemporal)な Wnt シグナル制御機構の解明を基盤とし、TPO/MPL シグナル、Notch シグナルおよび Ang1/Tie2 シグナルとの相互作用の分子機構を明らかにすることにより、歯髄再生の臨床応用の可能性を詳細に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

申請者は、共同研究を行っている千葉大学医学部小児科と国立感染症研究所の研究グループが世界で初めて樹立したヒト巨核球系細胞株 CMK を用いて PKC の役割および TPO/MPL シグナルの発現状況について詳細に解析を行い成果を挙げている (Cell Biol Int. 2008;32(6):692-7., Cell. Mol. Biol. 2003, 49:393-398, Sunohara M et al.). また、最近 TPO/MPL シグナルが造血幹細胞の維持に関与していることも示され (Cell Stem Cell, 2007, 1:685-697), さらに状況により、造血幹細胞の増殖にも関与する可能性も報告された (Cell Stem Cell, 2007, 1:671-684)。本研究において、申請者がすでに確立した上記方法を用いて、歯髄形成過程における PKC の機能解析および Wnt シグナル、Notch シグナルおよび Ang1/Tie2 シグナルと歯髄形成の分子メカニズムとの関連性を遺伝子発現解析法により明らかにすることにより、歯髄幹細胞とニッチ細胞間の相互作用に関与する分子メカニズムについて解明したいと考えている。

4. 研究成果

血管新生過程において内皮細胞および壁細胞の分化・成熟が時間的・空間的に制御されると考えられており、血小板造血機構が血管新生に関与しているとの報告もある。c-Mpl 受容体蛋白および c-mpl 遺伝子は E11.5~E18.5 日齢マウス胎児において時期特異的、部位特異的に明瞭に発現していることが確認され、E11.5~E18.5 日齢マウス歯胚発生過程における TPO/MPL シグナルの関与が確認された。

一方、歯胚発生過程における angiopoietin 1, angiopoietin 2 遺伝子の経時的発現状況を in situ hybridization 法を用いて解析を行なったところ、angiopoietin 1 遺伝子が胎生 11.5 日から 18.5 日齢マウス胎児のエナメル器、歯乳頭、歯胚周辺部間葉細胞において時期特異的、部位特異的に明瞭に発現していたのに対し angiopoietin 2 遺伝子の発現時期は極めて限定されていた。また、E15.5~E17.5 日齢の歯乳頭において angiopoietin1, Tie-2, Vegf-R2 遺伝子の強い発現が認められ、E14.5~E16.5 日齢の歯乳頭においては c-mpl 遺伝子の強い発現が認められたことから、angiopoietin1, Tie-2, Vegf-R2 遺伝子および TPO/MPL シグナルが歯胚領域血管新生過程における血管内皮細胞・壁細胞間相互作用に関与する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Promoter motifs required for c-mpl gene expression induced by thrombopoietin in CMK cells.

Sunohara M, Sato I, **Morikawa S**.

Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2017 Nov 30;63(11):119-123.

doi: 10.14715/cmb/2017.63.11.21.

[学会発表] (計 16 件 [国際発表 6 件])

2018:4(2)

1) Molecular control of vascular formation in developing mouse tooth germ,

Sunohara M, **Morikawa S**, Sato I, 96th Annual Meeting and Exhibition of the International Association for Dental Research, London, England, PROGRAM BOOK, 169, 2018.

2) Vasculogenesis and Angiogenesis during tooth germ development,

M. Sunohara, **S. Morikawa**, I. Sato, International Meeting of the German Society for Cell Biology, Leipzig, Germany, DGZ-2019-MEETING GUIDE, Cell News 02/2018, P08-11, DGZ, 91, 2018.

3) マウス胎児血管発生過程における各種シグナル伝達物質の関与の検討,
春原正隆, 佐藤巖, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会プログラム集, 359, 2018, 九州大学病院キャンパス百年講堂、福岡

4) Dynamics in vascularization during tooth development,

Masataka Sunohara, Shigeru Morikawa Iwao Sato
第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 講演プログラム・抄録集, 216, 2019,
朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、新潟

2017:3(1)

1) Contribution of the signaling molecules during vascular development in tooth germ,
Sunohara M, **Morikawa S**, Noguchi K, Sato I, Anatomische Gesellschaft, 112th Annual Meeting, Würzburg, Germany

2) 歯胚発生過程における血管形成制御因子の発現状況および局在の検討,
春原正隆, 佐藤巖, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 松本歯科大学、長野

3) Signaling molecules in embryonic vascular development of tooth germ,
Masataka Sunohara, Shigeru Morikawa Iwao Sato,
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、日本医科大学武蔵境校舎、
日本獣医生命科学大学

2016:3(1)

1) Crucial regulators of angiogenesis during tooth germ development,

Sunohara M, **Morikawa S**, Sato I, Anatomische Gesellschaft, 111th Annual Meeting, Göttingen, Germany

2) 歯胚血管新生過程における調節因子の同定,

春原正隆, 関伸一郎, 佐藤巖, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会,
札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

- 3) Role of signaling molecules in developmental angiogenesis of mouse embryo,
Sunohara M, Morikawa S, Sato I, The 122th Annual Meeting of The Japanese
Association of Anatomists, 長崎大学坂本キャンパス、長崎県長崎市

2015:3(1)

- 1) Signaling molecules involved in initial formation of blood vessels during tooth
development,
M. Sunohara, S. Morikawa, T. Yatsu, Y. Miwa, M. Yamazaki, I. Sato, 45th Annual
Meeting and Exhibition of the American Association for Dental Research, Los Angeles,
Calif.(USA)
- 2) Expression patterns of signaling molecules in vasculogenesis of mouse embryo,
Masataka Sunohara, Shigeru Morikawa, Iwao Sato, 第121回日本解剖学会総
会・全国学術集会,ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)
- 3) Molecular control of angiogenesis in tooth development,
Masataka Sunohara and Iwao Sato, 第57回歯科基礎医学会学術大会・総会,
朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

2014:3(1)

- 1) Molecular regulatory mechanism of angiogenesis during tooth morphogenesis.
M.Sunohara, S.Morikawa, H.Murata, I.Sato, IADR/PER Congress & Exhibition
2014, Dubrovnik, Croatia
- 2) Regulatory mechanism in differentiation of mesenchymal cells during tooth
development.
Sunohara Masataka, Morikawa Shigeru, Sato Iwao, The 120th Annual Meeting
of The Japanese Association of Anatomists, 神戸国際会議場・展示場(兵庫県
神戸市)
- 3) 歯胚発生過程における血管新生制御機構の解析,
春原正隆, 佐藤巖,
第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：森川 茂

ローマ字氏名：Morikawa Shigeru

所属研究機関名：国立感染症研究所

部局名：獣医科学部

職名：部長

研究者番号(8桁): 0 0 1 6 7 6 8 6

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。