

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670798

研究課題名(和文) 歯の発生における時間軸変更への挑戦

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanisms regulating the speed of tooth development

研究代表者

大峽 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯の発生における発生スピードに関わる分子を検索することを目的に行った。発生スピードを検索するためには、従来の蕾状期、帽状期、鐘状期を更に細分化した発生ステージの構築が必要となる。そこで、歯胚上皮の3D構築による歯胚の三次元的解析を行い、重要なステージの一つである帽状期における新たな発生ステージの作成に成功した。帽状期は、歯胚のサイズを大きく変えることなく形態変化を起こした後に、歯胚の容積を増やししながら形態を変化させていくことが明らかとなった。各ステージのマーカーとして利用できる各ステージ特異的分子の同定を試み、歯胚のより正確な誘導を促す培養法の確立が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the molecular mechanisms regulating the speed of tooth development. Developmental stage of odontogenesis (bud, cap and bell stage) had to be subdivided to examine developmental speed. We have successfully subdivided cap stage tooth germs (most critical point in tooth development) using three-dimensional analysis. The data indicate that early cap stage tooth germs change their shape without varying tooth germ volume. This is followed by a significant alteration in morphology, driven by increasing the tooth germ volume. Then, we tried to identify molecules that can be used as markers for each subdivided cap stage. However, the data so far suggest that new organ culture techniques - leading to more precise tooth development - need to be established to allow identification of these molecules.

研究分野：口腔解剖

キーワード：歯の発生 時間軸

1. 研究開始当初の背景

再生は発生過程の再現であり、再生療法の確立には、その器官の発生メカニズムの詳細な知見が必要不可欠となる。歯の再生においても同様に、その発生メカニズムの全貌解明は必須であり、申請者らも、歯数、歯冠形態、歯の位置、エナメル質形成等の制御メカニズムを分子レベルで追求してきた。iPS 細胞の開発により、患者の体細胞から作製した幹細胞を、歯胚細胞へと分化させる歯の再生療法が、理論上は可能となった。しかしながら、ヒトの歯の完成には非常に長い時間を要し、例えば下顎第一大臼歯の場合、歯胚形成から歯根完成までに約 10 年を要する。また歯冠部の石灰化だけでも数年が必要となり、ヒトの歯の再生療法を臨床レベルで実現していくには、歯の発生の忠実な再現の先に発生時間の短縮が必須となる。発生速度は、動物種間でみられる絶対寿命の反映でしかないと推察される一方、正常に発生する遺伝子改変マウスで、いくつかの器官発生に遅延の生じている事が認められ、発生の時間軸を司るメカニズムの存在が示唆される。しかしながら、歯の発生速度を制御する分子メカニズムは、議論すらされていない。本研究では歯の発生速度を制御する分子の同定を目指す。

バイオサイエンスにおいて、cell line を用いた培養細胞によりもたらされる情報量はきわめて多く、器官発生学も例外ではない。しかし、歯の発生においては、各分化程度を認知するマーカーが存在していないため、いまだ cell line の確立がなされておらず、歯の発生研究の発展を大きく妨げている。本研究で目指す時間軸の制御分子の解明は、各分化段階のマーカー同定にもつながり、歯胚 cell line の確立にも大きく貢献できると考えられる。また、時間軸を司る遺伝子の同定は、歯周組織や歯髄などの老化のメカニズム解明にも繋がる可能性が極めて高い。高齢者における新しい齲蝕や歯周治療の開発への貢献も期待できる。さらに動物種間には、体の絶対サイズや絶対寿命などが存在し、その意義やメカニズムは明らかにされていない。本研究の検索は、そのような生物学全体における疑問の解明への足掛かりともなりうる。器官発生における速度制御の分子レベルでの研究は、他の器官の発生研究においても行われておらず、本研究での発見や模索する手法は、他の器官発生にも応用可能と考えられ、歯の発生研究を超えた発展性、拡張性が期待できる。歯の発生は、上皮と間葉が協調的にスピードをコントロールしていると考えられ、本研究成果から、新しい側面の上皮-間葉相互作用が明らかとなる可能性も予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯の発生速度に関連する

分子を同定し、歯の発生速度の制御機構を解明することにある。現在まで分子レベルでの歯の発生メカニズム研究は多くなされているものの、発生速度という視点にたった研究は皆無である。そのため速度制御に関与する分子の同定は全くなされておらず、本試み自体が非常に大きな挑戦となる。歯の発生は、組織切片による観察を元に、上皮肥厚期、蕾状期、帽状期、鐘状期の4つに区分されているが、これは発生速度の詳細な評価には不十分であり、新たな区分(ステージ)作成を必要とする。歯胚は非常に複雑な形態をしており、組織切片による形態観測のみからのステージ作成には限界がある。そこで、歯胚上皮の3D構築による3次元形態解析からのステージ作成を試みる。歯の発生速度にわずかな変化が生じる実験系での分子レベルの変動を追求することにより、歯の発生スピードを制御する分子の同定を行う。本制御機構の解明は再生療法への展開・応用のみならず、老化メカニズムにも繋がるデータが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 胎仔の体重による歯胚の形態の3次元レベルでの把握

歯の発生スピードを正確に測定するため、従来の4つの歯の発生のステージ(上皮肥厚期、蕾状期、帽状期、鐘状期)をさらに細分化する必要がある。しかし、上皮肥厚期、蕾状期、帽状期、鐘状期の全てのステージを本研究のターゲットにすることは難しく、焦点を絞る必要がある。鐘状期移行の歯胚の形態変化は、それ以前に比べ緩慢となるため、ターゲットとして好ましくない。さらに我々は Barx1 の欠損により、歯の発生速度が変化することを報告した(PNAS 108:19270-5, 2011)。Barx1 欠損マウスでは、帽状期初期において発生の遅延が認められ、その遅延がその後の発生スピードの加速により、鐘状期までの間に通常のステージに追いつく。これらは、帽状期に時間軸を握る大きな分子機構が存在する可能性を示している。そこで、本研究では、上皮肥厚期、蕾状期、帽状期、鐘状期の中で、Barx1 欠損マウスで変化の引き起こした帽状期に焦点を絞って、解析することとした。そもそも上皮肥厚期、蕾状期、帽状期、鐘状期は、前頭断の組織切片における歯胚上皮の形で分けられたものであり、他の矢状断などの組織切片における、歯胚上皮は明確な蕾状、帽状、鐘状を呈すわけではない。これらのことは、組織切片作成時の薄切の角度によって、歯胚上皮の形態は大きく変わってしまうことを意味する。さらに、歯胚は、近遠心的に幅のある組織であり、上皮肥厚期、蕾状期、帽状期、鐘状期の上皮の蕾状、帽状、鐘状という形態が近心から遠心まで全ての歯胚の断面で認められるわけではない。つま

り歯胚の近遠心それぞれの部位で歯胚上皮は違う形態を示す。このように組織切片のみによる判定は、より詳細な発生ステージの作成を目的とする本研究にはそぐわない。そのため、切片ではなく、歯胚全体で把握することが必要となる。そこで、近心から遠心まで、作成した連続組織切片から歯胚上皮を三次元構築し、その歯胚全体の形態からステージの細分化を行う。これにより、組織切片作成時における薄切の角度の影響を排除することができる。過去に歯胚の三次元構築の報告はあるが、今回は新しい2D スライス画像の組み合わせと領域区分け抽出法をベースにした3次元構築ソフトを使用することにより、より精密で正確な画像認識が可能になる。

一方、発生初期では、同腹子間でも若干の歯胚形成時期に大きな違いがあることは知られている。つまり歯胚の詳細な区分けには、同腹子間でもステージの仕分けが必要であることを意味し、マウスを用いた発生研究で使用されている vaginal plug に併用する新たな分別法が必要となる。発生初期では同腹子の胎仔で体重が異なることが報告されている。帽状期は、胎生(E) 14.5日付近とされている。そこで、E 14.5日におけるわずかな発生ステージの違いの検知のため、各胎仔の体重を測定し、それぞれの組織切片から歯胚を三次元構築した。体重による大別と3次元構築の併用は、今までも報告はあるが、3次元構築ソフトの向上により、より詳細な形態が認識でき、正確なステージ区分けが期待できる。さらに、精密な三次元画像を得ることは、その後の形態変化の認められる部位での発現遺伝子の変位解析にも必須である。

(2) 各ステージ歯胚間における分子レベルでの相違検索

本研究は、歯胚上皮の三次元的形態解析からステージ作成を試みる。しかし3次元観察も、形態による分類であるため、その区分けの精度には限界が生じる。そこで、より正確で、より細分化されたステージ作成のために、各ステージにおける分子マーカーを同定し、その利用を試みる。3次元観察による新しいステージ分類に、分子マーカーを統合させることにより、全く次元の違う新しいステージ作成が可能となる。そのために(1)で確認された形態的に変化のある部位に特異的に発現している分子の同定のために、レーザーマイクロダイセクション法により、変化部位からRNAを抽出し、PCR等を行った。また、PCRでマーカーとなり得ると判断した分子は、in situ hybridizationや免疫染色で、当該領域のみに発現するか確認した。

(3) 発生スピード関連遺伝子の同定

再生療法には発生スピードの加速が求められるものの、加速のための分子を直接同定

することは、現段階では不可能である。一方、初期歯胚は数日間、器官培養法により正常に培養することが可能であるが、その際、若干の発生速度の遅延が認められる。そこで Wild-type(正常)マウスを、様々な培養法や様々な培養条件で培養し、その際それぞれに生じるわずかな発生速度の違いから、速度制御分子の同定を試みる。同じ遺伝子を有する同系列の Wild type(正常)マウスを使用することにより、遺伝子変化の検索がより確実なものとなる。体重によりグループ分けした正常マウスの下顎を、各器官培養法(Trowell法、roll bottle法、slice法)にて同じ条件で24時間培養し、歯の発生進行状況を(1)と同様の方法で三次元解析を行い、その形態変化を確認した。

4. 研究成果

(1) 胎仔の体重による歯胚の形態の3次元レベルでの把握

各マウスの系統で胎仔の重さは異なるが、E 14.5日付近では、CD1系統では、140mgから350mgまでの胎仔が獲得され、それぞれの重さで組織切片を作成し、歯胚上皮の3次元構築を行い、形態的検索を行った。

140mg付近の重さの胎仔では、歯胚の尾側の上皮がフラット~やや凸状の形態を示していた。それらの形態は歯胚の近遠心軸の中央付近にわずかに認められるのみで、そ

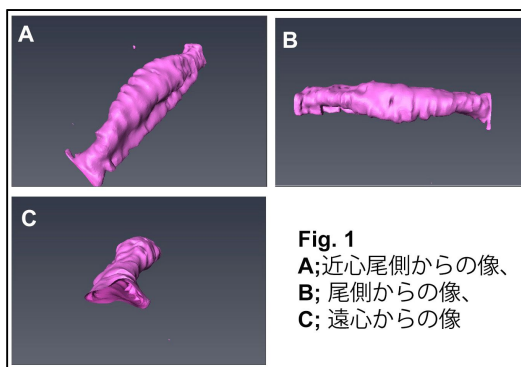


Fig. 1
A;近心尾側からの像、
B; 尾側からの像、
C; 遠心からの像

の面積も非常に小さいものであった。それ以外の近遠心の上皮は、蕾状期にみとめられる鋭端な上皮形態を示していた。また、エナメル結節と推察されるような構造体は認められなかった。このような歯胚の形態は、おおむね220mgの胎仔まで観察された。(Fig. 1)

胎仔がおおむね250mgを越えると、歯胚の形態に、大きな変化が認められるようになった。歯胚の近遠心的な長さに変化はないものの、中央部の頬舌方向での幅が大きくなっていった。140mg付近の胎仔で、フラット~やや凸状の形態を示していた尾側の上皮は、辺縁部の上皮が隆起してきたことにより、わずかに凹状を呈していた。辺縁部の上皮の隆起は頬側が著明で、舌側辺縁部はわずかな隆起しか示さなかった。このような歯胚の形

態は、おおむね340mgの胎仔まで観察された。また、エナメル結節と推察されるような構造体は認められなかった。(Fig. 2)

それに対し、胎仔がおおむね350mgを越えると、歯胚の近遠心方向および頬舌方向の双方への増殖が認められた。辺縁部の隆起は更におおきくなり、250mg付近の胎仔で認められた歯胚中央部の凹状部の深さが増していた。凹状部の底部にエナメル結節と思われる突起状の構造体が認められた。一方、辺縁部の隆起は、頬舌軸で対象ではなく、頬側の隆起が大きく、幅も厚く、近遠心的にも舌側に比べ長かった(Fig. 3)

おおむね、140mg、250mg、350mgが、形態的なターニングポイントと示唆された。140mgまでの歯胚を帽状フラット期、140mgから250mgまでの歯胚を帽状隆起期、250mgから350mgまでを帽状結節期とした。使用した三次元構築ソフトでは、歯胚の容積を計算できる。帽状フラット期の歯胚が、約490万マイクロ立方メートルであった。帽状隆起期の歯胚は、約560万マイクロ立方メートルであり、帽状フラット期の歯胚の容積と比べ、大きな変化は認められなかった。それらに対し、帽状結節期の歯胚は1800万マイクロ立方メートルであり、帽状隆起期の歯胚から大きく増加していた。

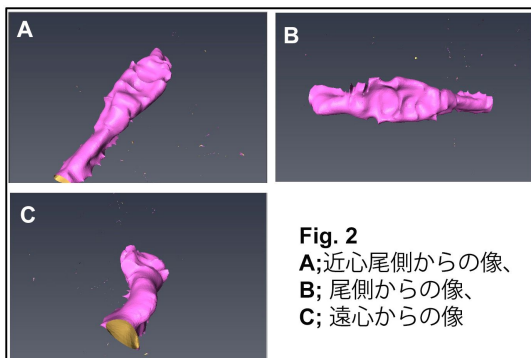


Fig. 2
A;近心尾側からの像、
B; 尾側からの像、
C; 遠心からの像

これらのことは、帽状フラット期から帽状隆起期までの歯胚の形態変化は、歯胚のサイズをほとんど変えることなく行われたことを意味する。それに対し、帽状結節期では、歯胚のサイズを大きく増加させることで、形態を変化させていることが示唆された。

(2) 各ステージ歯胚間における分子レベルでの相違検索

(1)の結果から、歯胚形態が大きく変

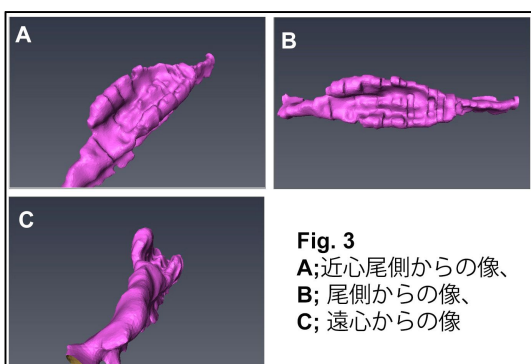


Fig. 3
A;近心尾側からの像、
B; 尾側からの像、
C; 遠心からの像

化する帽状フラット期、帽状隆起期、帽状結節期の間での、最大の変化は辺縁部の隆起であった。そこで、頬舌側の辺縁部それぞれから、レーザーマイクロダイセクションによりRNAを採取し、それぞれ特異的な分子の同定を試みた。特に、歯胚のサイズを変えることなく、歯胚の形態を変化させた帽状フラット期と帽状隆起期との間の胎仔の比較には注意を払った。PCRにて、マーカーとなり得ると推察された分子は複数あったものの、発現部位を確認したところ、違う重さの胎仔の歯胚の他の部位に認められるなど、マーカーとなりうる分子の同定には至らなかった。

(3) 発生スピード関連遺伝子の同定

発生スピード関連遺伝子を同定するために、体重によりグループ分けした正常マウスの下顎を、各器官培養法(Trowell法、roll bottle法、slice法)にて培養し、得られた組織における歯胚の三次元解析を、(1)と同様の方法により行った。しかし、培養後の形態が、正常マウスのいかなる体重の胎仔でも認められる形態ではなかった。それらの形態は、通常の歯の分子発生メカニズム研究には支障のない程度の軽微なものであったが、本研究目的にはそぐわないレベルのものであった。これらのことは、発生スピード関連遺伝子の同定には、3次元レベルで、完全に正常な発生を誘導する器官培養法の確立が必要であることが示された。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0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

大峽 淳 (OHAZAMA, Atsushi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号： 40266169

(2) 研究分担者

前田 健康 (MAEDA, Takeyasu)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号： 40183941

河野 芳郎 (KAWANO, Yoshiro)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号： 60303129

(3) 連携研究者

()

研究者番号：