

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 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：26670848

研究課題名(和文)口蓋粘膜の歯形成上皮へのリプログラミング

研究課題名(英文) Reprogramming of palatal mucosa into tooth-forming epithelium

研究代表者

前田 健康 (MAEDA, TAKEYASU)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40183941

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)：歯と口蓋皺壁の発生中における発現分子の違いを、マウスを用いて検索した。口蓋皺壁の間葉は、歯胚と同様に、神経堤由来であることが確認された。口蓋皺壁の発生中に、Bmp4やLrp4等多くの歯の関連遺伝子の発現が認められ、Shh、Bmp等の歯の発生で認められるシグナルも発生中の口蓋皺壁で活性化していた。一方、Msx1は口蓋皺壁発生で発現していなかった。口蓋皺壁に発現する遺伝子の改変マウスでも口蓋皺壁の走行に異常が認められた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular differences between tooth and palatal rugae development in wild-type mice. In common with tooth germ cells, mesenchymal cells of the developing palatal rugae were found to be derived from the neural crest. Many tooth-related genes such as Bmp4 and Lrp4 showed expression in the palatal rugae, and signaling pathways including Bmp and Shh (which are known to regulate tooth development) were also activated during palatal rugae formation. However, expression of several tooth-related molecules including Msx1 could not be detected within the developing palatal rugae. Transgenic mice with altered expression of the molecules found in the developing rugae exhibited highly disorganized palatal rugae.

研究分野：歯学

キーワード：口蓋皺壁 歯の発生

## 1. 研究開始当初の背景

我々の体は、進化の過程でさまざまな変化を経て現在の形質を獲得しており、発生期間中に認められる多様な形態的变化はその進化の過程での変化そのものであるとされ、進化の経緯の痕跡をすべての器官の発生過程に垣間見ることができる。そのため発生過程に発現する遺伝子も進化の間に刷り込まれたものとなり、器官発生の分子メカニズムの完全解明には、進化からの視点は欠かせない。歯の再生療法への期待から歯の発生機構の解明が行われているものの、更なる詳細な歯の発生機構の解明にはブレークスルーとなる従来の観点と異なる新しいアプローチが必要であるが、歯の発生の分子レベルでの解明を、進化の面から解析した報告は皆無である。

カンブリア紀から三畳紀の海に生息した生物であるコノドントをはじめとする多くの古代生物は、口蓋、下顎正中部、咽頭など、顎堤以外の多数の部位に歯を有する。このような顎堤以外の多くの口腔部位に存在していた歯は、進化の過程で多くが消失した。哺乳類の先祖となる古代生物も口蓋に歯を有していたものの、現存する哺乳類の口蓋に歯は存在しない。しかしながら、現存のヘビなどでは口蓋に未だ多数の歯を認める。一方、ヒトにおける過剰歯の94%が上顎で認められ(Int J Paediatr Dent 12:244-254,2002)、その多くが口蓋側で観察されること、口蓋の先天異常に過剰歯を伴い易いことは、ヒト口蓋に歯の形成能が、いまだ潜在することを伺わせる。また、我々は一次繊毛タンパクである *Odf1* 遺伝子欠損マウスで、口蓋に歯胚の存在を確認している。すなわち、哺乳類では歯の形成能が通常口蓋で抑制され、何らかの変調によりその抑制機構が喪失され、過剰歯が誘発されるという仮説を導くことができる。この口蓋における歯の形成抑制は、進化の過程で獲得されたものと考えられる。一方、現存の全ての哺乳類の口蓋には口蓋皺壁が認められ、その発生過程での歯の関連遺伝子の発現が報告されている (Nat Genet 44:348-51, 2012, Gene Expr Patterns 10:193-198, 2010)。この口蓋皺壁が、進化の過程で退化した歯の残遺である可能性は極めて高い。

iPS細胞の開発により、歯の再生は患者の細胞からの幹細胞による手法が可能となった。この幹細胞の歯胚細胞への誘導は、生体が進化してきた過程を再現することであり、「進化からのアプローチ」は再生療法に対する新しい歯の発生研究の展開としての意義も高い。さらに、歯の発生メカニズムを理解するには、他の研究で盛んに行われている誘導分子の同定だけでなく、歯の発生にとって抑制すべき遺伝子の同定をも行う必要がある。そのため、進化の過程でいかなる抑制分子の獲得により、口蓋における歯の形成が喪

失されたかを知る意義は、極めて大きい。

## 2. 研究の目的

本研究では口蓋皺壁を利用して歯の進化プログラムの解明に挑む。最終目標としては、口蓋皺壁と歯との分子レベルでの比較検討し、口蓋皺壁の歯へのリプログラミングを試み、口蓋や歯が進化の過程で獲得/喪失した遺伝子を同定することであり、そこから新たな歯の発生の分子機構研究の展開を図ることを、本研究のアウトカムとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯と口蓋皺壁の形態と発生時期の解析

口蓋皺壁も歯と同様に、上皮と間葉の2つの組織から発生する。口蓋皺壁の発生は上皮の肥厚と肥厚上皮直下の間葉細胞の凝集という歯胚と全く同じ形態変化からスタートし、その後口蓋皺壁独自の形態へと変化していく。そこで、歯胚と口蓋皺壁間の発現遺伝子の比較を、胎生の同日齢間ではなく、同一の形態を示す時期の間で行うこととした。そのため、どの時期の胎仔の特定の口蓋皺壁が、特定の形態を示すことを認知するための新たな指標が必要となる。そこで、胎仔の体重に着目し、胎仔体重と口蓋皺壁の関連性を組織学的に検索した。

### (2) 口蓋皺壁間葉細胞の発生由来の検索

歯は、上皮-間葉相互作用により発生し、その間葉のほとんどの細胞は神経堤由来である。しかし、口蓋皺壁の間葉が、神経堤由来であるかは、明らかにされていない。そこで、R26Rマウスを用いて、口蓋皺壁の間葉細胞の発生的由来を検索した。

### (3) 歯と口蓋皺壁間の発現遺伝子の比較検討

歯と口蓋皺壁で、いかなる遺伝子が両組織に、いかなる遺伝子が口蓋皺壁のみに、いかなる遺伝子が歯胚のみに発現するかを、in situ hybridization 法、免疫染色法、Quantitative PCR 法、RT-PCR 法で検索した。

### (4) 遺伝子改変マウスの解析

上記の結果を元に、口蓋皺壁と歯の形成に関連すると予想される遺伝子の改変マウスを作成し、口蓋皺壁に変化が生じているか検索した。

### (5) Wild-type マウスの口蓋皺壁への遺伝子導入による解析

歯胚と口蓋皺壁間で異なる発現を示す遺伝子を、Wild-type の口蓋皺壁にエレクトロポレーションで発現させ、口蓋皺壁の変化を検索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 歯と口蓋皺壁の形態と発生時期の解析

歯胚は、上皮肥厚期、蕾状期、帽状期、鐘状期のステージに分けられるが、この中で上皮肥厚期から蕾状期までが、歯と口蓋皺壁間で形態が類似する期間となる。現在まで報告された各種遺伝子改変マウスで、歯が欠損したものの多くが、上皮肥厚期後期で歯の発生が停止していた。つまり、歯や口蓋皺壁などの進化の過程において、上皮肥厚期後期に大きな変化があったと考えられる。そこで、歯胚、口蓋皺壁それぞれの上皮肥厚期後期の遺伝子変化を検索することとした。mRNAの回収を高めるために、口蓋突起が水平位になり、組織量がよく採取できる胎生 (E) 14日付近をターゲットとした。マウスの口蓋皺壁は、近心から9本の皺で構成されるが、各皺の形成時期はそれぞれ異なる。E14日付近では、近心から5、6、7番目の皺が、上皮肥厚期になると考えられるが、vaginal plugによるE14日の判定では、5、6、7番目の皺が、上皮の肥厚前から上皮肥厚期後期を越え上皮突出期までのいずれかを示してしまい、vaginal plugによる判定は上皮肥厚後期に絞った実験には不向きである。歯胚はE12日付近が上皮肥厚期後期となるものの、口蓋皺壁と同様に、vaginal plugによるE12日の判定では、上皮の肥厚から上皮肥厚期後期を越え蕾状期までのいずれかを示してしまう。そのため、vaginal plug以外の発生時期の判定法が必要となる。そこで、歯胚と口蓋皺壁それぞれが上皮肥厚期後期になる時期を、胎仔の体重で推察することができるか検索した。各マウスの系統で重さは異なるが、E14日付近では、CD1系統で、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形態的検索を行った所、5、6、7番目の皺の形態と胎仔の重さに関連性を見出し、各マウスの系統で、5、6、7番目の皺が上皮肥厚期後期となる胎仔の重さが同定できた。同様に、歯胚が上皮肥厚後期となる時期の体重も把握できた

##### (2) 口蓋皺壁間葉細胞の発生由来の検索

口蓋皺壁の間葉細胞が神経堤由来であるかを検索するために、Cre リコンビネーゼの発現細胞のみにYFPを発現させることのできるR26Rマウスと、神経堤由来細胞のみにCre リコンビネーゼを発現させるWnt1Creマウスを交配させた。得られたR26R;Wnt1Creマウス胎仔を観察した結果、ほとんどの口蓋皺壁間葉細胞がYFP陽性細胞であり、口蓋皺壁の間葉細胞が神経堤由来であることが示された。(Fig. 1)

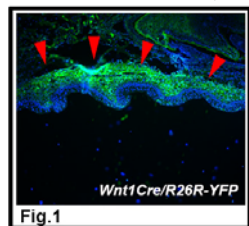


Fig. 1

##### (3) 歯と口蓋皺壁間の発現遺伝子の比較検討

Bmpは歯の発生に重要な遺伝子であり、その欠如は、歯の発生を上皮肥厚期後期で停止させることが知られている。哺乳類では、約20種類のBmpが確認されている。現在まで器官発生で重要な役割の報告されている複数のBmpに焦点を絞り、それらのBmpが口蓋皺壁発生に発現するか検索した。その結果、Bmp2は上皮肥厚期後期の上皮下の間葉に、Bmp4、Bmp5、Bmp7は、肥厚上皮に発現していた。一方、そのレセプターであるBmpr1aは間葉に、Bmpr1bは肥厚上皮以外の上皮に発現していた。BmpのインヒビターであるNogginも、肥厚上皮以外の上皮に発現していた。これらのことは、Bmpが、上皮-間葉相互作用を担う分子であること、Bmpのシグナル活性はリガンドとインヒビターのバランスで決定されていることを示唆している。Bmpシグナル活性を検索するために、Bmpシグナル活性のマーカーであるp-Smad1/5/8の免疫染色を行った結果、Bmpシグナルは肥厚上皮で活性

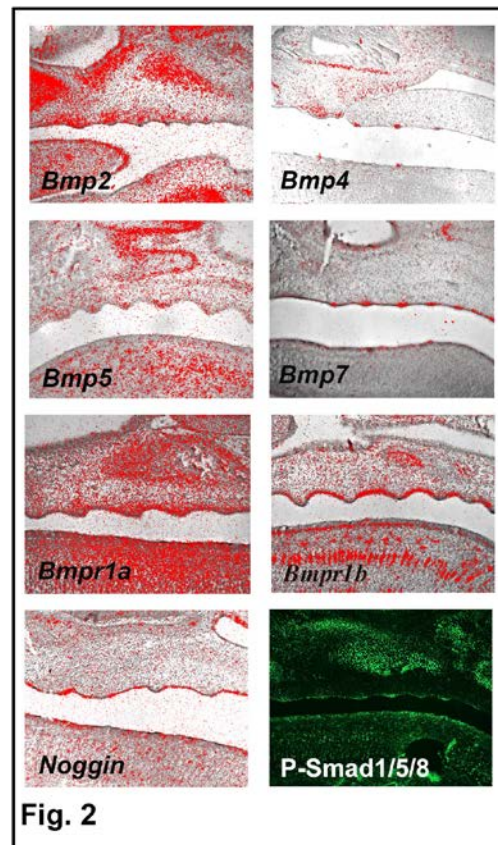


Fig. 2

していることが明らかとなった。(Fig. 2)

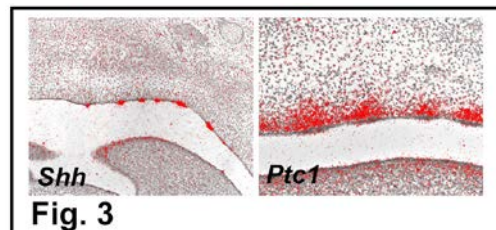
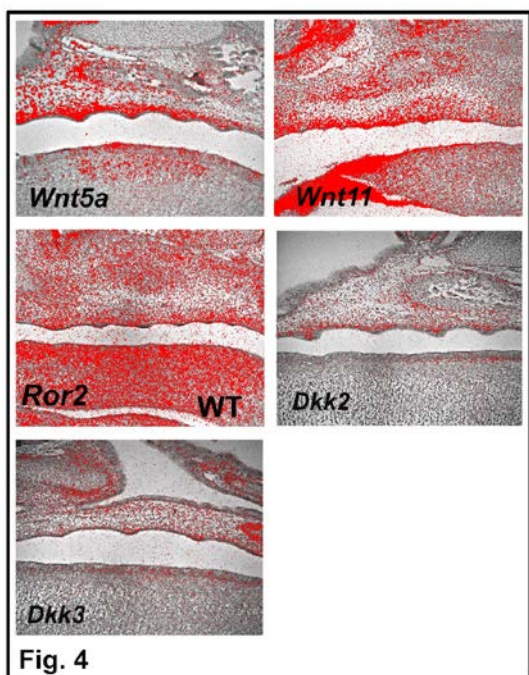


Fig. 3

Shhシグナルも歯に重要なシグナルであ

ることが知られている。リガンドである Shh は肥厚上皮に発現していたが、その活性を示すマーカーであり、レセプターでもある Ptc1 は肥厚上皮直下の間葉に発現していた。Shh も、上皮-間葉相互作用を担う分子であることが示唆された。(Fig. 3)

Wnt シグナルも歯に重要なシグナルである。Wnt シグナルには、canonical 経路と non-canonical 経路があり、non-canonical 経路に関わる分子である Wnt11、Wnt5a、Ror2 の発現が間葉で認められた。インヒビターである Dkk のうち、Dkk2 と Dkk3 の発現が同様に間葉で観察された。Wnt のシグナル活性はリガンドとインヒビターのバランスで決定されていることを示唆している。口蓋皺壁の上皮肥厚期で non-canonical 経路が活性化していた一方で、歯の発生の上皮肥厚期では non-canonical 経路の役割は小さいと考えら



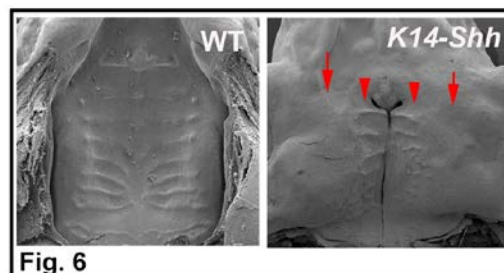
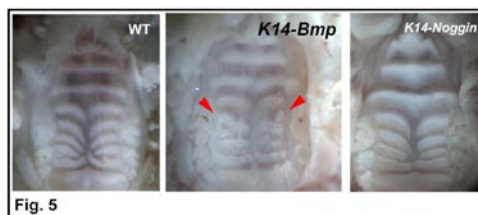
れており、Wnt シグナルの違いが、歯と口蓋皺壁形成の違いを引き起こしている可能性が示唆された。(Fig. 4)

欠損マウスにおいて、歯の発生が上皮肥厚期後期で停止する遺伝子に、Runx2、Pitx2、Msx1、Pax9、Lef1 があげられる。Pitx2 と Lef1 は肥厚上皮に、Pax9 は、肥厚上皮直下の間葉に発現していた。しかし、Msx1 と Runx2 の発現は認められなかった。歯胚と口蓋皺壁での Msx1 と Runx2 の発現の違いが、歯と口蓋皺壁という器官の違いを引き起こしている可能性が示唆された。

#### (4) 遺伝子改変マウスにおける口蓋皺壁の解析

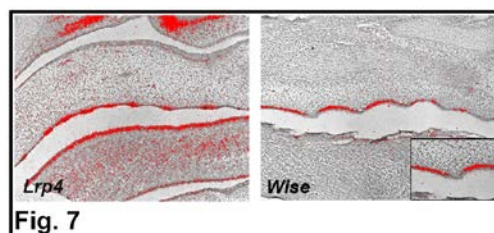
Bmp シグナルを抑制するために、インヒビターである Noggin が上皮で過剰発現しているマウス (K14-Noggin) を作成したが、口蓋皺壁に形態的变化は認められなかった。次に Bmp シグナルを上昇させるため、器官発生に

最も重要であり、歯に必須の分子であることが知られている Bmp4 が上皮で過剰発現したマウス (K14-Bmp4) を作成し、口蓋皺壁を検索した。口蓋皺壁の走行に乱れが生じていたものの、口蓋皺壁の歯への転換を示す兆候は観察されなかった。(Fig. 5)

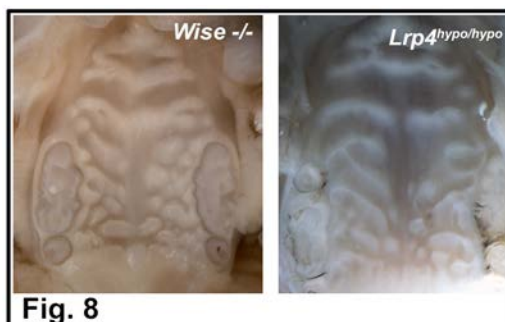


歯の発生に必須の Shh を上皮で過剰発現させたマウスを作成した。口蓋皺壁が一部消失することは確認できたものの、口蓋皺壁の歯への転換を示す兆候は観察されなかった。(Fig. 6)

分泌タンパクである Wise は、Bmp と結合することにより Bmp シグナル活性に関与する。さらに Wise は Wnt のレセプターに結合することで Wnt シグナル活性も制御する。このように、Wise は Bmp と Wnt を同時にコントロールする分子である。Wise 欠損マウスに過剰歯が存在することが報告されている。そこで、Wise の口蓋皺壁での発現を検索した所、肥厚上皮間の上皮に局限した発現を示した。さらに、Wise と結合能を持ち、その欠損によって Wise と同様の過剰歯の形成が引き起こる



Lrp4 の発現を検索した結果、肥厚上皮に局限した発現を示した。(Fig. 7) Wise と Lrp4



が、口蓋皺壁で相互作用を有している可能性

がある。そこで、Wise 欠損マウスと Lrp4 欠損マウスを作成し、その口蓋を検索した。両欠損マウスの皺の走行は著しく乱れ、一部欠損や過剰な皺等が確認できたものの、口蓋皺壁の歯への転換を示す兆候は観察されなかった。(Fig. 8)

(5) Wild-type マウスの口蓋皺壁への遺伝子導入による解析

歯胚に発現し、口蓋皺壁に発現しない遺伝子のうち、遺伝子欠損マウスで歯の発生が上皮肥厚期後期で停止する Msx1 と Runx2 を、上皮肥厚期後期の Wild-type マウスの口蓋皺壁にエレクトロポレーションで導入した。しかし口蓋皺壁の歯への転換を示す兆候は観察されなかった。

本研究では、口蓋皺壁と歯の分子レベルでの違いを認識し、その違いを応用することで、口蓋皺壁の歯へのリプログラミングを試みた。口蓋皺壁と歯との間で多くの遺伝子が共有されていることが明らかとなった。その中でいくつかの分子が、口蓋皺壁と歯で違うことが確認された。それら分子の改変で、口蓋皺壁に異常が引き起こることが確認された。

## 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

前田 健康 (MAEDA, Takeyasu)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号 : 40183941

(2) 研究分担者

大峽 淳 (OHAZAMA, Atsushi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号 : 40266169

井上 佳世子 (野澤 佳世子) (INOUE, Kayoko [NOZAWA, Kayoko])

新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号 : 90303130

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :