

マウス歯胚形成過程におけるThymosin beta 10の発現様式解析と機能解析

福田, 真帆
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/26325>

出版情報：九州大学, 2012, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

マウス歯胚形成過程における
Thymosin beta 10 の発現様式解析と機能解析

2013 年

九州大学大学院歯学府
口腔保健推進学講座 歯科矯正学分野

福田（塩塚） 真帆

九州大学大学院歯学研究院
口腔保健推進学講座 歯科矯正学分野

指導教員： 高橋 一郎 教授

九州大学大学院歯学研究院
口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学研究分野

研究指導教員： 坂井 英隆 教授

本研究の一部を下記の論文に投稿中である。

Expression and Function of Thymosin beta 10 in the tooth germ development. -A Comparative study with Thymosin beta 4-

Maho Shiotsuka, Hiroko Wada, Tamotsu Kiyoshima, Kengo Nagata, Hiroaki Fujiwara, Makiko Kihara, Kana Hasegawa, Hirotaka Someya, Ichiro Takahashi, Hidetaka Sakai

International Journal of Developmental Biology

また、本文の内容の一部は下記の学会および研究会において発表した。

第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2010 年 9 月 22 日 タワーホール船掘（千葉）口頭発表

マウス歯胚形成過程における Thymosin β 10 と Thymosin β 4 との発現様式の比較検討

第 87 回九大病理研究会

2010 年 12 月 11 日 九州大学 百年記念講堂（福岡）口頭発表

歯胚発生期から咬合完成期における Thymosin β 10 発現様式と機能について
-thymosin β 4 との比較検討-

The 6th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science”

Mar. 4th, 2011. Fukuoka. Oral presentation

Expression pattern and possible function of thymosin beta 10 in developing tooth germ compared with thymosin beta 4.

第 100 回日本病理学会総会

2011 年 4 月 28 日 パシフィコ横浜（神奈川）口頭発表

歯胚形成過程における Thymosin β 10 の役割 ～Thymosin β 4 との比較検討～

第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2012年9月15日 奥羽大学（福島）口頭発表

マウス歯胚形成を制御するThymosin β 10の発現様式解析と機能解析

略語表

bp: base pair

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

Cont: samples treated with universal negative control siRNA

DAB: 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

DEPC: diethyl pyrocarbonate

DE: dental epithelium

DIG: digoxigenin

DM: dental mesenchyme

DPBS: DEPC-treated PBS

DP: dental pulp

E10.5: embryonic day 10.5

EO: enamel organ

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

FBS: fetal bovine serum

FITC: fluorescein isothiocyanate

HE: hematoxylin-eosin

HERS: Hertwig's epithelial root sheath

Ki67: antigen identified by monoclonal antibody Ki-67

kDa: kilo-dalton

mDP: mouse dental pulpal cell line

mDE6: mouse dental epithelial cell line (clone 6)

mRNA: messenger ribonucleic acid

NTMT: NaCl + Tris-HCl + MgCl + Tween 20

O/N: overnight (16-18 hrs)

PBS: phosphate buffered saline

PBST: PBS + Tween 20

PEK: primary enamel knot

PFA: paraformaldehyde

P0: postnatal day 0

RT: room temperature

RT-PCR: reverse-transcription polymerase chain reaction

siRNA: small interfering RNA

SM: surrounding mesenchymal cells

stDDW: sterilized deionized distilled water

T β 4: Thymosin beta 4

T β 10: Thymosin beta 10

T β 10 siRNA: samples treated with *T β 10* siRNA

TBS: tris base + sodium chloride

TBST: TBS + Tween 20

TE: Tris-HCl + EDTA

3T3SA: 3T3-Swiss Albino

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling

Tween 20: polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate

Ut: untreated samples

目次

1. 要旨.....	1
2. 緒言.....	3
2-1: 再生歯科医療の必要性.....	3
2-2: 歯胚発生.....	4
2-3: 本研究の背景.....	6
2-4: Tβ10 の分子構造と機能.....	7
2-5: 研究目的.....	8
3. 材料と方法.....	9
3-1: 実験動物.....	9
3-2: 発現様式解析.....	9
a) <i>in situ</i> Hybridization 法.....	9
b) Real-time PCR 法.....	13
3-3: 機能解析.....	14
a) 器官培養法.....	14
b) 細胞培養法.....	16
3-4: 統計解析.....	17
4. 結果.....	18
4-1: 発現様式解析.....	18
4-2: 機能解析.....	37
5. 考察.....	48
6. 総括.....	51
7. 謝辞.....	54
8. 参考文献.....	55

1. 要 旨

口腔病理学研究室では、これまでに歯胚発生に関わる遺伝子群について検出・同定を行い、それらの検出因子の一つである Thymosin beta 4 (Tβ4) について歯胚における特異的発現様式や機能的役割に関する報告を行った。その研究過程において、Tβ4 と高相同性を有する Thymosin beta 10 (Tβ10) がマウス胎生 15.5 日齢 (E15.5) 歯胚に発現していることを見出し、Tβ4 mRNA が歯原性上皮細胞に強く発現しているのとは対照的に、Tβ10 mRNA は主に歯乳頭細胞に発現することを確認した。本研究では、マウス歯胚形成過程における Tβ10 の発現様式と機能について解析することを目的とした。

in situ Hybridization 法を用いた Tβ10 と Tβ4 の mRNA 発現局在検索の結果、歯胚形成過程において Tβ4 mRNA が上皮組織に発現しているのに対し、Tβ10 mRNA は主に歯原性間葉由来の組織に発現していた。また、胎生期における Tβ10 mRNA の発現部位は細胞増殖が活発な部位と一致していた。帽状期や鐘状期の歯胚では Tβ10 mRNA の発現は主に歯乳頭組織に、Tβ4 mRNA の発現はエナメル器に認められた。さらに、出生直後では Tβ10 mRNA の発現は前象牙芽細胞と前エナメル芽細胞に、Tβ4 mRNA の発現は前エナメル芽細胞にのみ認められた。歯根形成期では、Tβ10 mRNA の発現はヘルトヴィッヒ上皮鞘 (Hertwig's epithelial root sheath, HERS) や、その周囲の歯原性間葉系細胞に認められたが、Tβ4 mRNA の発現は認められなかった。

Real-time PCR 法を用いた mRNA の定量解析では、下顎において E10.5 より E12.0 に、胎生期歯胚においては E18.0 より E15.0 に、生後歯胚においては生後 5 日齢 (P5) より P1 に、Tβ10 と Tβ4 の発現量増加が認められた。また、胎生期の脳、胸腺、脾臓、腎臓、心臓、肝臓、肺における Tβ10 と Tβ4 の mRNA 発現局在を検索した結果、全ての臓器において Tβ10 や Tβ4 の発現が認められ、

それらの発現量は胎生期と比較して生後に減少した。

siRNA による Tβ10 機能阻害下で E11.0 下顎と E15.0 歯胚を 8 日間培養し、Tβ10 の影響を組織形態学的に検索したところ、Tβ10 siRNA 群では有意な歯胚の形態形成不良が認められた。歯胚発育不良の原因を追求するために、細胞増殖活性への影響を Ki67 免疫組織染色にて、アポトーシスへの影響を TUNEL 法にて検索した。その結果、Tβ10 siRNA 群の下顎と歯胚に細胞増殖活性の低下が認められた。一方、Tβ10 siRNA 群においてアポトーシスへの影響は下顎と歯胚ともに認められなかった。また、マウス歯髄細胞 (mDP) とマウス歯原性上皮細胞 (mDE6) を用いて siRNA 処理による Tβ10 の機能阻害を行ったところ、細胞増殖活性の低下が認められた。これより、Tβ10 は主に歯胚を構成する細胞の増殖活性を制御することで、歯胚形成に関与していることが示唆された。

本研究により、Tβ10 が歯胚形成過程において、時期および部位特異的に発現し、歯胚の発育や形態形成に関与する必須の因子であることが示唆された。

2. 緒 言

2-1: 再生歯科医療の必要性

近年では、口腔領域の健康に関する啓蒙活動の普及により、小児の齲蝕経験歯数が減少し、高齢者の残存歯数が増加してきた。このように、健康に対する個人の意識レベルを高めることで、齲蝕や歯周疾患等の後天的疾患による歯・歯周組織の喪失は可及的に防ぐことが出来る。

しかしながら、歯数異常（先天性欠損・過剰歯）や歯牙形態形成異常（矮小歯・円錐歯）等の先天性疾患は、個人の努力で改善することは不可能である。矯正歯科の臨床では、しばしばこのような先天性疾患が原因による歯列不正症例に直面する。歯列不正や咬合異常は、審美的・機能的障害を伴うことで生活の質の低下を招く可能性があるため、歯科矯正治療によって審美的・機能的障害を適切な時期に改善することが望ましい。

歯科矯正治療において、先天性疾患による上下顎歯冠幅径総和の不調和を修正・修復することは非常に重要な課題となる。現在では健全な歯質の割合による修復に加え、新たな人工材料の開発やインプラントを含めた種々の保存修復・補綴処置技術の向上により、より自然の状態に近い修正・修復が行われている。しかし、基本的には天然歯による審美的・機能的回復が理想である。この観点から注目されるのが歯胚の再生に基づく天然歯による修復である。

現在では、歯胚器官原基法の開発によって、マウス歯胚の上皮性幹細胞と間葉系幹細胞を用いて歯胚を再生させることが可能となり（Nakao et al., 2007）、さらに再生歯胚が成獣顎骨内で十分に機能することが実証された（Ikeda et al., 2009; Oshima et al., 2011）。これより、歯胚再生の具現化には上皮-間葉相互作用が極めて重要なステップとなることが明らかとなった。従って、歯胚の発生・

発育過程における部位特異的に発現する遺伝子の同定、細胞間情報伝達機構および細胞内の複雑な分子機構の解明が必須となる。

2-2: 歯胚発生

歯胚の発生・発育機序の解明は歯胚再生実現に多くの情報をもたらすと考えられる。歯胚の発生はヒトでは胎生 6 週頃、マウスでは胎生 10 日目から認められ、外胚葉性頭部神経堤細胞由来の間葉系細胞の誘導により口腔粘膜上皮層が肥厚し歯原性上皮細胞へと変化することから開始する (Thesleff et al., 1995)。歯胚発生初期の歯原性上皮細胞では、Bone morphogenetic protein (BMP)、Fibroblast growth factor (FGF)、Sonic hedgehog (SHH)、Wingless-type MMTV integration site family (WNT) および Tumor necrosis factor (TNF) 等の様々な分子が発現することがこれまでに報告されており (Thesleff, 2003; Thesleff et al., 1999; Vanio et al., 1993)、これらの分子が引き起こす上皮-間葉相互作用により間葉組織にも様々な分子が発現していく (Mina, 2001; Tucker et al., 1998; Tucker et al., 1999)。このように、上皮細胞と間葉系細胞の相互作用による連続した過程により歯は形成され、Fig. 1 のような段階を経て成長する。歯胚の発生における分子機構は、全てが解明されている訳ではなく、未だに報告されていない多数の因子が関与している可能性がある。

- 歯堤 : 歯原性上皮が局所的に外胚葉性間葉組織に向かって増殖する。
この時期の上皮細胞の分裂速度や成長速度は周囲の間葉と比較して著しく低い。
- 蕾状期 : 歯堤から間葉組織に向かって上皮の陥入が認められ、上皮は蕾状を呈する。歯蕾の周囲には間葉系細胞が密に集合する。
- 帽状期 : 間葉系細胞が急速に増殖して歯乳頭を形成する。これにより、歯原性上皮組織は帽状を呈するエナメル器となる。この時期、エナメル器中央部で非分裂上皮細胞が密集したエナメル結節 (PEK) が形成され、PEK 以外の上皮細胞でのみ増殖活性が認められる。
- 鐘状期 : エナメル器は鐘状となり歯冠の最終的な形態を呈す。歯冠硬組織を形成する細胞は特有の形態を示すようになり、エナメル器では外側の外エナメル上皮、中心部の星状網、内エナメル上皮と星状網の間に中間層が認められる。

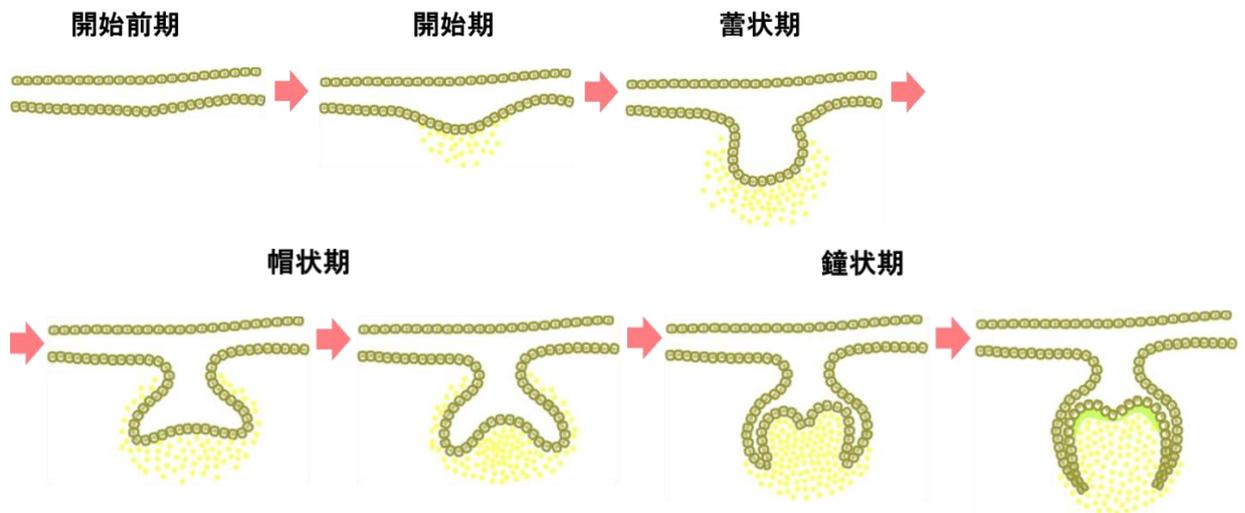
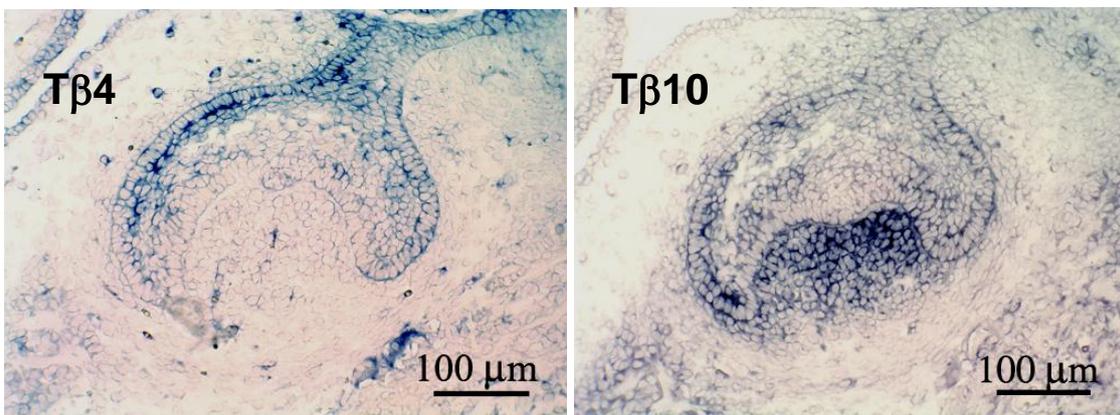


Fig. 1 歯の発生

2-3: 本研究の背景

口腔病理学研究室では、歯胚発生初期に関与する新たな分子を検索する目的でcDNA subtraction法および半定量的RT-PCR法を用いて、マウスE10.5とE12.0の下顎に差異的に発現する遺伝子の同定を行い(Yamaza et al., 2001a)、同定された遺伝子群について歯胚形成過程における発現様式解析と機能解析を行ってきた(Akhter et al., 2005, 2010; Honda et al., 2008, 2011; Kobayashi et al., 2006; Ookuma et al., 2012; Takahashi et al., 2010; Wada et al., 2002; Xie et al., 2007, 2009; Yamaza et al., 2001b)。これらの検出された因子の一つであるT β 4遺伝子に関しても、同様にmRNA発現様式について報告し(Akhter et al., 2005)、T β 4が歯胚の発育・分化を制御することについて明らかにした(Ookuma et al., 2012)。

一方、T β 4と高相同性を有する因子としてT β 10が知られている。本研究室では、このT β 10がマウスE15.5歯胚においてT β 4とは対照的な様式で発現していることを研究過程で見出し(Fig. 2)、T β 10がT β 4と同様に歯胚の発生・発育および歯原性細胞の分化に関連している可能性が示唆された。



Akhter et al., 2005, *Histochem. Cell. Biol.*, 124

Fig. 2 マウスE15.5下顎第一臼歯歯胚におけるT β 4とT β 10のmRNA発現局在

2-4: T β 10 の分子構造と機能

T β 10 は β -thymosin family に属する 43 個のアミノ酸から成る 4.9kDa の水溶性ペプチドであり、高相同性を有する T β 4 とは 11 個のアミノ酸が異なる (Fig. 3A)。T β 4 が哺乳類の組織において全 β -thymosin 量の 70~80% に相当するのに対し、ヒトやラット、マウスにおいては T β 10 の発現量は少ない。 β -thymosins の主な機能は、単量体である G-actin と 1 : 1 で結合し複合体を形成してアクチンフィラメントの重合調節を行うことである (Yu et al., 1993)。この機能により、細胞の移動に必要とされるアクチンの再配列を行うことが可能となるため、T β 10 は T β 4 と同様に細胞の移動能にも関与していると考えられている (Sun et al., 1996; Lin et al., 1991)。また、T β 10 はアクチンの重合調節によって細胞分裂を制御し細胞増殖に関与するのみならず、ニューロンにおける神経突起形成伸長を制御する働きを担っている (van Kesteren et al., 2006; Maltman et al., 2011)。

さらに、T β 10 は Ras との直接的相互作用 (Lee et al., 2005) により血管新生抑制効果を有する (Zhang et al., 2009)。これは T β 4 の血管新生促進効果とは対照的である (Philip et al., 2004)。また、T β 4 が心筋細胞や上皮前駆細胞においてアポトーシスを抑制するのに対し (Bock-Marquette et al., 2004; Zhao et al., 2011)、T β 10 は胚形成や腫瘍形成においてアポトーシスを促進するという報告もある (Lee et al., 2001; Kim et al., 2012; Choi et al., 2006; Hall et al., 1995) (Fig. 3B)。

このように、T β 10 は他の β -thymosins と同様に多機能を有するため、歯胚の発生においても重要な役割を担っている可能性がある。

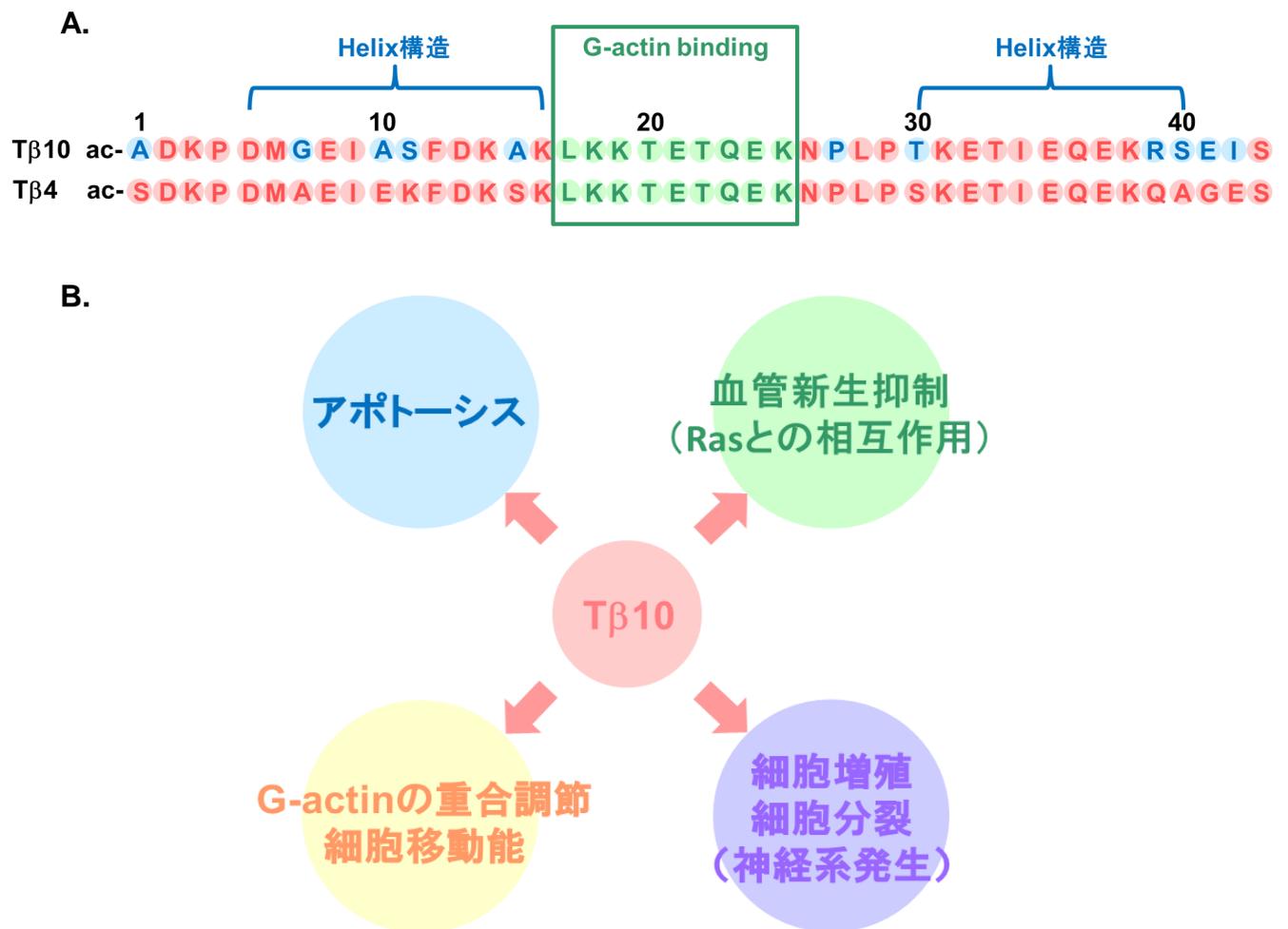


Fig. 3 Tβ10 の構造と機能

A: Tβ10 と Tβ4 のアミノ酸配列の比較

B: Tβ10 の機能

2-5: 研究目的

これまでの研究結果および過去の報告を踏まえ、本研究では *in situ* Hybridization 法による歯胚発生過程における Tβ10 遺伝子の発現様式の検索、および器官培養法と siRNA による Tβ10 遺伝子発現制御を組み合わせた手法による機能解析を行い、歯胚発生過程における歯原性細胞の増殖や分化における Tβ10 遺伝子の機能的役割を明らかにすることを目的とした。

3. 材料と方法

3-1 : 実験動物

当動物実験は、九州大学歯学研究院等動物実験委員会による承認のもと、「九州大学動物実験規則」を遵守して行った。使用した実験動物は日本チャールズ・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) より購入した BALB/c マウスである。九州大学大学院 歯学研究院 基礎動物飼育室にて飼育し、雌雄マウス (雌: 生後 10-20 週) の自然交配を行った。胎齢は雌雄マウスを同居させ、12 hrs 後に膣栓の確認をもって E0.5 とした。

3-2 : 発現様式解析

a) *in situ* Hybridization 法

組織試料作製

「九州大学動物実験規則」に従い、ジエチルエーテルによる吸入麻酔を行い、無痛下にて妊娠母獣より E10.5、E12.0、E13.5、E14.0、E14.5、E15.5、E16.5、E18.0 の胎仔を取り出した。E10.5 と E18.0 の胎仔は全身を、それ以降の胎仔は頭部を DEPC 処理した PBS (DPBS, pH7.4) にて作製した 4% PFA (Merck, Daemstadt, Germany) 中に浸漬固定した (4°C・24hrs)。同様の方法で P1、P2、P3、P5、P7 マウスの頭部と P14 マウスの全身も浸漬固定した。通法に従い、スクロース (Wako, Osaka, Japan) で置換し、組織を O.C.T compound (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) に凍結包埋した後、厚さ 5 μ m の連続凍結切片を作製し、3-amino-propyltriethoxy-Silane (Sigma, Louis, ST, USA) 処理したスライドガラス上に貼付した。

RNA probe の作製

Tβ10 と Tβ4 mRNA に対する RNA probe を作製するにあたり、Tβ10 では NM_025284.3 (NCBI Reference Sequences) の 5'-UTR や 3'-UTR 配列を含む probe の primer を設計し、Tβ4 では NM_021278.2 の 3'-UTR 配列を含む probe の primer を設計した。RNA probe の primer 配列は下記の通りである。

Tβ10	Forward primer: 5'-GCT CGG AAG GAG AAT CCA CG-3'
	Reverse primer: 5'-CTA TAA TAT CCC AGG GCAAAC CG-3'
Tβ4	Forward primer: 5'-ATG TCT GAC AAA CCC GAT ATG-3'
	Reverse primer: 5'-CTC TCT ATT TCA TCA TCT CCC-3'

これらを用いて PCR にて標的とする DNA fragment を増幅し、pGEM-3Z vector (Promega, WI, USA) の制限酵素 *EcoRI* と *BamHI* の切断部位間にサブクローニングを行った。Antisense probe への DIG の標識には DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を用いた。コントロールとして sense probe/ non-labeled probe も作製し、以下の種類の probe を準備した。両分子の probe の塩基配列の一致率は 43.14%であった。

Tβ10	: DIG-labeled sense/antisense probe
	non-labeled sense/antisense probe
Tβ4	: DIG-labeled sense/antisense probe
	non-labeled sense/antisense probe

Filter Hybridization 法

in situ Hybridization 法に使用する RNA probe の特異性を確認するために filter 上にて検定を行った。non-labeled sense probe を TE buffer (pH8.0) にて順次 10 倍希釈し、1 μ l ずつ cellulose membrane (Hybond-N + membrane, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) に滴下した。UV crosslinker にて固定 (120mj/cm²)、probe を加熱変性 (80°C · 5min) 後、DIG-labeled antisense probe 含有ハイブリソリューション (50% 脱イオン化ホルムアミド、10% デキストラン硫酸ナトリウム、1% デンハルト溶液、250 μ g/ml 酵母トランスファーRNA、0.3mM 塩化ナトリウム、20mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)、5mM EDTA、10mM リン酸二水素ナトリウム、1% N-ウラロイルサルコシン) にて反応させた (55°C · O/N)。Membrane を 10% ヤギ正常血清 (Nichirei Co. Ltd, Tokyo, Japan) にて非特異的反応のブロッキング (RT · 1hr) 後、アルカリフォスファターゼ標識 DIG 抗体 (1 : 500) と反応させ (RT · 1hr)、BM purple (Roche) にてハイブリダイズした RNA probe を可視化し、観察した。また、吸収試験にて、DIG-labeled antisense RNA probe と non-labeled sense probe との反応性を、競合試験にて DIG-labeled antisense RNA probe と Non-labeled antisense probe との拮抗性を確認した。DIG-labeled antisense RNA probe の濃度は検出可能な最小濃度に設定した。

in situ Hybridization 法

作製した連続凍結切片を送風にて乾燥後、DPBS (pH7.4) にて作製した 4% PFA で固定を行った (氷上 · 10min)。0.01M DPBS (pH7.4) にて洗浄 (RT · 5min × 2) 後、0.2mg/ml プロテインキナーゼ K (Invitrogen) で処理した (RT · 2min)。再度、0.01M DPBS で洗浄 (RT · 5min) 後、4% PFA で固定を行った

(氷上・5min)。0.01M DPBS で洗淨後、0.25% 無水酢酸 (Wako) を含む 0.1M トリエタノールアミン塩酸塩 (pH7.5, Sigma) で処理し (RT・15min)、0.01M DPBS で洗淨した。70%、95% エタノール (Wako) による脱水後、よく乾燥させ、RNA probe を含むハイブリダイゼーション溶液 (50% 脱イオン化ホルムアルデヒド、10% デキストラン硫酸ナトリウム、1% デンハルト溶液、250 μ g/ml 酵母トランスファーRNA、0.3mM 塩化ナトリウム、20mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)、5mM EDTA、10mM リン酸二水素ナトリウム、1% N-ウラロイルサルコシン) 中でハイブリダイゼーションを行った (55 $^{\circ}$ C・O/N)。50% ホルムアミドを含む 2 \times SSC で洗淨 (65 $^{\circ}$ C・30min \times 2)、NTE buffer (0.5M 塩化ナトリウム、10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)、5mM EDTA) で洗淨 (37 $^{\circ}$ C・10min \times 3) 後、20 μ g/ml RNase A 処理を行った (37 $^{\circ}$ C・30min)。再度、NTE buffer で洗淨 (RT・15min) 後、50% ホルムアミドを含む 2 \times SSC (65 $^{\circ}$ C・20min)、2 \times SSC (37 $^{\circ}$ C・15min)、0.1 \times SSC (37 $^{\circ}$ C・15min)、0.1% Tween 20 を含む 0.01M PBS (PBST) で洗淨した (RT・15min)。10% ヤギ正常血清 (Nichirei) でのブロッキング (RT・1hr) 後、1% ヤギ正常血清を含む PBST で 5000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche) にて反応させた (4 $^{\circ}$ C・O/N)。PBST (RT・2hrs \times 4)、NTMT buffer (0.1M 塩化ナトリウム、0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH9.5)、50mM 塩化マグネシウム、0.1% Tween 20) にて洗淨 (RT・10min \times 3) 後、0.5mg/ml レバミゾールを含む BM-purple (Roche) により標的 mRNA にハイブリダイズした RNA probe を可視化した (RT・O/N)。切片を TE buffer で洗淨 (RT・15min) 後、グリセリンにて封入し、観察した。

b) Real-time PCR 法

E10.5 および E12.0 のマウスから下顎を、E15.0、E18.0、P1、P5 から歯胚を採取し、E18.0 と P14 のマウスから脳、胸腺、脾臓、肺、膵臓、腎臓、心臓、肝臓を摘出し、SV Total RNA Isolation system (Promega) にて各々から total RNA を抽出した。SuperScript® VILO™ cDNA synthesis system (Invitrogen) を用いて total RNA から cDNA を合成した。Real-time PCR は、Thermal Cycler Dice® Real Time system (Takara Bio Inc. Shiga, Japan) を用い、PCR 反応液として、SYBR® Green I 含有の SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara)、0.5µM PCR Forward/Reverse primers および 100ng の template cDNA を使用した。PCR 標準プロトコール（初期変性: 95°C・30sec, 2step PCR: 95°C・5sec, 60°C・30sec, 40cycle）に従い、PCR 反応液を反応させた。Real-time PCR に用いたプライマー配列は下記の通りである。

Tβ10	Forward primer: 5'-AAC GAG AGT GGG AGC ACC TG-3'
	Reverse primer: 5'-AGC TTG GCC TTA TCG AAG CTG-3'
Tβ4	Forward primer: 5'-CTG ACA AAC CCG ATA TGG CTG A-3'
	Reverse primer: 5'-ACG ATT CGC CAG CTT GCT TC-3'
GAPDH	Forward primer: 5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3'
	Reverse primer: 5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3'

3-3 : 機能解析

a) 器官培養法

器官培養

E11.0 のマウスから採取した下顎および E15.0 のマウスより摘出した下顎第一臼歯歯胚を口腔病理学研究室が改良した方法を用いて器官培養した。採取した E11.0 下顎、E15.0 歯胚をそれぞれ Filter (0.8mm pore size, Millipore, Billerica, MA) 上に静置し、前者を 24 well plate に、後者を 48 well plate に静置した。100 μ g/ml アスコルビン酸を添加した 5% ウシ胎仔血清 (FBS, Filtron, Brooklyn, Australia) 含有 BGJb 培地 (Invitrogen) にて 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下で培養し、24 hrs 毎に培養液の交換を行った。

siRNA 法

T β 10 mRNA 配列と相補的な塩基配列を有する 21bp から成る siRNA を設計し、T β 10 に対する siRNA の導入を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) にて行った。培養液 1ml 中に siRNA が 30pmol、Lipofectamine RNAiMAX が 3 μ l となるように最終濃度を調節し、Lipofectamine RNAiMAX-siRNA 複合体を 24hrs 毎に交換した。コントロールとして未処理培養群 (Ut)、Universal negative control siRNA (Sigma) を添加し培養した群 (Cont) を準備し、T β 10 に対する siRNA を添加し培養した群 (T β 10 siRNA) の結果と比較した。T β 10 に対する siRNA の配列は下記の通りである。

T β 10 siRNA

5'-GGUUUGCCCUGGGAUUUUATT-3'
3'-TTCAAACGGGACCCUAUAAU-5'

siRNA による T β 10 発現抑制効果の検索

8 日間培養した E11.0 下顎と E15.0 歯胚の各 Ut 群、Cont 群、T β 10 siRNA 群について、それぞれ少なくとも 3 個ずつ回収し、SV Total RNA Isolation system にて total RNA を精製した。Total RNA から cDNA を合成後、Real-time PCR を行い、T β 10 の発現量を定量した。

組織学的検索

8 日間培養した E11.0 下顎と E15.0 歯胚をそれぞれ回収し、4% PFA で浸漬固定を行った (4°C・24hrs)。PBS 洗浄、エタノール脱水、キシレン置換、パラフィン包埋の後、連続切片を厚さ 5 μ m で作製した。切片を 42°C で乾燥後、通法に従って HE 染色を行った。顕微鏡を用いて組織学的検索を行った。

Ki67 免疫組織染色法

器官培養法で作製した連続切片を使用した。抗原賦活化のために熱処理を行い、内因性ペルオキシダーゼ活性は 95% メタノールと 0.3% 過酸化水素水 (RT・20min) で非活性化した。10% ヤギ正常血清 (Nichirei) にてブロッキング (RT・60min) 後、125 倍希釈 Ki67 一次抗体 (AB43302, Abcam) 処理を行った (4°C・16hrs)。次に、二次抗体である抗ウサギ IgG 抗体 (シンプルステインマウス MAX-PO (R), Nichirei/414351) にて処理を行い (RT・30min)、3,3-diaminobenzidine (シンプルステイン dab, Nichirei/415174) による可視化とヘマトキシリンによる核染色を行った。Ki67 陽性細胞を E11.0 歯胚では歯原性上皮組織 (DE)、歯原性間葉組織 (DM)、歯胚周囲間葉組織 (SM) の 3 区画に分け、E15.0 歯胚ではエナメル器 (EO)、歯髄組織 (DP) の 2 区画に分けて

数え、Ki67 陽性細胞/全細胞の比率を算出した。

TUNEL 法

器官培養法や Ki67 免疫組織染色法で使用した切片の連続切片を使用し、10µg/ml プロテインキナーゼ K (Invitrogen) で処理を行った (RT・15min)。内因性ペルオキシダーゼ活性を 95% メタノールと 0.3% 過酸化水素水にて非活性化し (RT・5min)、TdT enzyme (Takara In Situ Apoptosis Detection Kit; Takara) にて標識化 (37°C・2.5hrs) 後、Propidium iodide (PI) にて核染色を行った。E11.0 下顎では、TUNEL 陽性細胞を歯原性上皮組織 (DE)、歯原性間葉組織 (DM)、歯胚周囲間葉組織 (SM) の 3 区画に分け、E15.0 歯胚ではエナメル器 (EO)、歯髄組織 (DP) の 2 区画に分けて数え、TUNEL 陽性細胞/全細胞の比率を算出した。

b) 細胞培養法

細胞培養

マウス歯髄細胞 (mouse dental pulpal cell, mDP、東京理科大学・斉藤正寛准教授より供与) とマウス歯原性上皮細胞 (mouse dental epithelial cell、mDE6、東北大学・福本敏教授より供与) を、10% FBS 含有 DMEM/F-12 medium (Invitrogen) にて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

siRNA による Tβ10 発現抑制効果の検索

mDP と mDE6 を 6 well plate に 3.0×10^5 ずつ播種した。器官培養法で用いた 2 種の siRNA を使用し、不活化した RNA ウイルスベクターである

HVJ-envelope (HVJ-Neo; GenomOne series, Ishihara Sangyo Ltd, Osaka, Japan) を用いて siRNA (1.67 μ g/ml) の導入を行った。siRNA 添加 48hrs 後に、各サンプルを回収し、SV Total RNA Isolation system にて total RNA を精製した。Total RNA から cDNA を合成後、Real-time PCR を行った。

細胞増殖曲線

mDP と mDE6 を 6 well plate にそれぞれ 3.0×10^5 個の細胞を播種し、HVJ-envelope を用いて siRNA (1.67 μ g/ml) の導入を行った。siRNA 添加 24hrs 後、48hrs 後の細胞数を計算した。

3-4: 統計解析

Table 1 と 2 は χ^2 独立性の検定 (chi-square for independence test) により解析し、有意差の判定を行った。Real-time PCR 法を用いた mRNA 定量解析は、GAPDH によりそれぞれの遺伝子 Ct 値を補正し、 $\Delta \Delta Ct$ 法により相対定量を行った。マウス各臓器における T β 10 と T β 4 の mRNA 定量解析 (Fig. 13) や器官培養下における siRNA による T β 10 発現抑制効果の検索 (Fig. 14)、Ki67 陽性細胞比率 (Fig. 16B, Fig. 18B)、TUNEL 陽性細胞比率 (Fig. 16D, Fig. 18D)、細胞培養下における siRNA による T β 10 発現抑制効果の検索 (Fig. 19A, C) の有意差は多重比較検定 Tukey-kramer 法を用い、マウス歯胚形成期における mRNA 定量解析 (Fig. 11) は Student's t 検定を用いて判定した。

4. 結 果

4-1: 発現様式解析

a) RNA probe の検定

in situ Hybridization 法で使用する Tβ10 と Tβ4 の antisense probe を作製し、その特異性を FH 法で評価した。Tβ10 antisense probe の検出可能濃度は 1ng/μl であり、Tβ10 sense 鎖の用量依存性にハイブリダイズすることが確認できた。また吸収試験や競合試験では、non-labeled sense probe もしくは non-labeled anti-sense probe を加えることで Tβ10 antisense probe と Tβ10 non-labeled sense probe との結合力が低下し、probe の特異性が確認された (Fig. 4)。

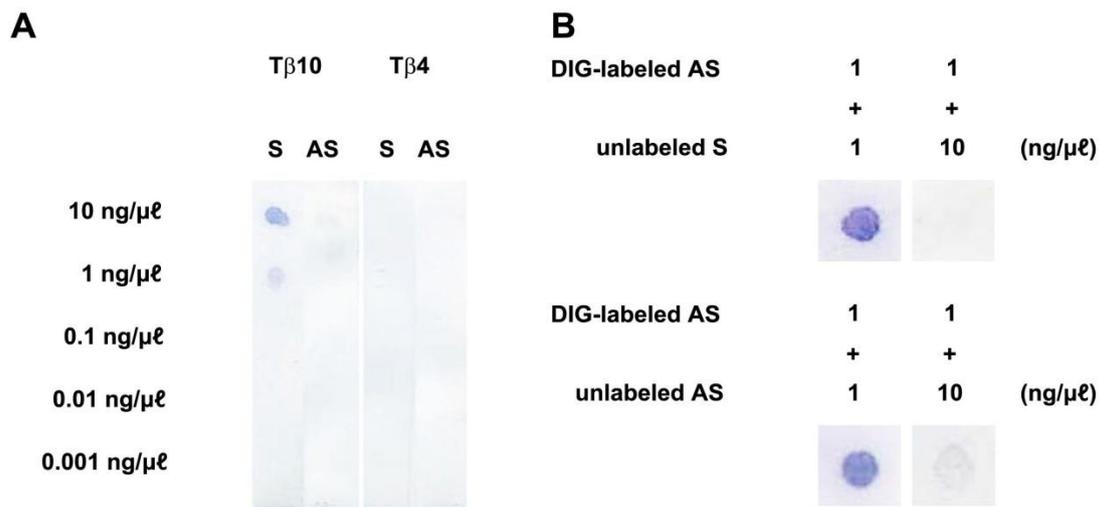


Fig. 4 Tβ10 と Tβ4 の RNA probe の検定

A: filter hybridization により DIG 標識 Tβ10 antisense probe の検出可能濃度は 1ng/μℓ であった。B: DIG 標識 Tβ10 antisense probe の吸収試験(上段)と競合試験(下段)。これより Tβ10 antisense probe の特異性が確認できた。

b) マウス歯胚形成期における T β 10 と T β 4 の mRNA 発現局在

開始期 (E10.5)

口腔粘膜上皮層の肥厚は認められなかった。T β 10 mRNA は口腔粘膜上皮層直下の間葉系細胞に著明に発現していた。また、わずかに口腔粘膜上皮細胞にも発現が認められた。T β 4 mRNA の発現は歯蕾相当部の上皮細胞に認められた。間葉組織中の血管内皮細胞にも発現していた (Fig. 5A, B)。

歯原性上皮肥厚期 (E12.0)

歯蕾形成相当部の口腔粘膜上皮に局所的な肥厚が認められた。T β 10 mRNA の発現は間葉組織全体に認められ、特に肥厚した口腔粘膜上皮に面した部位の間葉系細胞において著明に認められた。また、歯蕾相当部の口腔粘膜上皮細胞にも弱く発現していた。T β 4 mRNA の発現は歯蕾相当部の口腔粘膜上皮細胞に認められた。また血管内皮細胞にも発現が認められた (Fig. 5C, D)。

蕾状期 (E13.5-E14.0)

肥厚した口腔粘膜上皮層は間葉に陥入し、歯蕾を形成していた。E13.5 下顎において、歯原性上皮由来の歯蕾を取り囲む間葉系細胞に T β 10 mRNA の著明な発現が認められた。また、下顎の間葉組織全体と上皮組織においてびまん性に弱い T β 10 mRNA の発現が認められた。T β 4 mRNA の発現は歯蕾に強く認められ、歯蕾周囲の間葉系細胞にはほとんど認められなかった。このように、E13.5 下顎における T β 10 と T β 4 の mRNA 発現様式は対照的であった。E14.0 下顎においても、T β 10 と T β 4 の mRNA は E13.5 と同じ発現様式を示していた。またこの時期においても、T β 4 mRNA の発現は血管内皮細胞に認められた (Fig. 5E-H)。

Tβ10

Tβ4

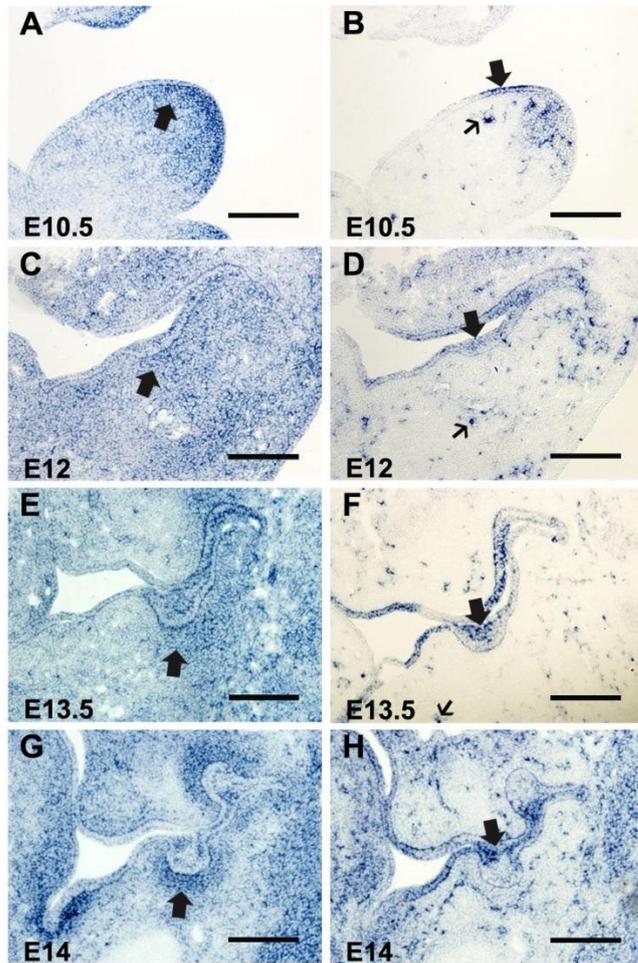


Fig. 5 胎生期マウス下顎第一臼歯歯胚における Tβ10 と Tβ4 mRNA の発現局在

A, C, E, G: Tβ10 mRNA 発現。B, D, F, H: Tβ4 mRNA 発現。A, C: 歯胚形成開始期において Tβ10 mRNA の発現は上皮直下の間葉組織に著明に認められた(矢印)。B, D: Tβ4 mRNA の発現は主に口腔粘膜上皮に認められた(矢印)。また、血管内皮細胞にも発現が認められた(小矢印)。E, G: 蕾状期では Tβ10 mRNA の発現は歯蕾周囲の間葉系細胞に強く認められた(矢印)。F, G: Tβ4 mRNA の発現は歯蕾を構成する上皮細胞に認められた(矢印)。scale bars: 100μm

帽状期 (E14.5-E15.5)

歯蕾は帽状を呈し、明らかなエナメル器への発育を示していた。E14.5 歯胚において、歯乳頭部全体に T β 10 mRNA の発現が著明に認められた。また、歯小囊の間葉系細胞には弱い発現が認められた。エナメル器の外エナメル上皮細胞にも T β 10 mRNA の発現が認められた。T β 4 mRNA の発現は外エナメル上皮とエナメル結節 (PEK) に強く認められた。しかし、内エナメル上皮には T β 4 mRNA の発現がほとんど認められなかった。E15.5 において、T β 10 mRNA が E14.5 と同様の発現様式を示すのに対し、T β 4 mRNA の PEK における発現は消失していた (Fig. 6A-D)。

鐘状期前期 (E16.5-E18.0)

エナメル器のサービカルループは間葉組織を包み込むように陥入し、エナメル器は鐘状を呈していた。E16.5 と E18.0 において、T β 10 mRNA の発現は内エナメル上皮に接する歯乳頭細胞に認められ、特に将来咬頭部となる部位で強く認められた。内エナメル上皮にもわずかに T β 10 mRNA の発現が認められた。一方、帽状期では発現していた外エナメル上皮や口腔粘膜上皮における発現が認められなかった。T β 4 mRNA の発現は E16.5 において外エナメル上皮と歯堤細胞に強く認められ、内エナメル上皮にも弱く認められた。E18.0 においても T β 4 mRNA は E16.5 と同様の発現様式を示し、歯乳頭細胞には認められなかった。また、この時期においても、T β 4 mRNA の発現は血管内皮細胞に認められた (Fig. 6E-H)。

Tβ10

Tβ4

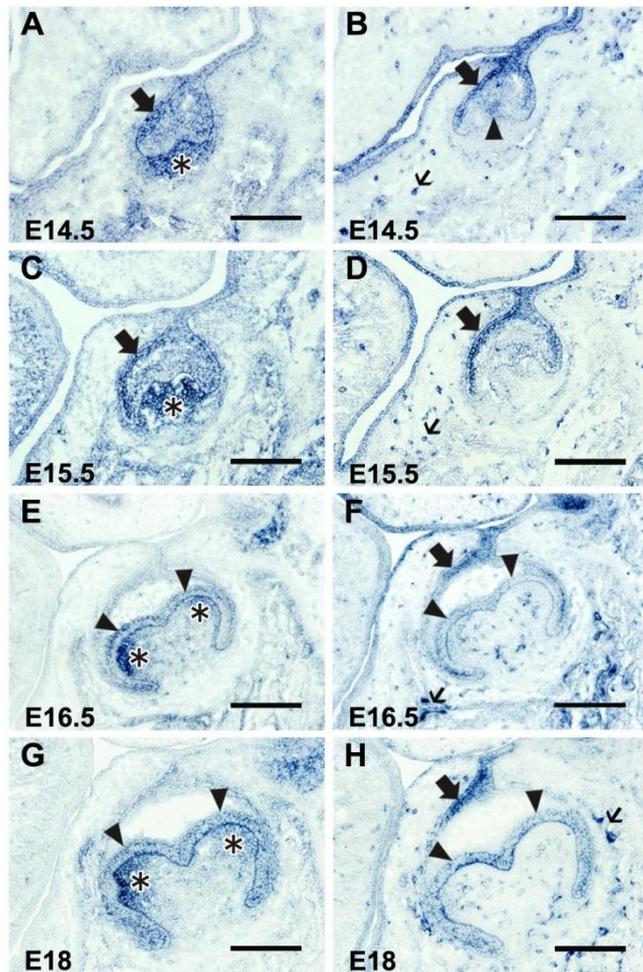


Fig. 6 胎生期マウス下顎第一臼歯歯胚における Tβ10 と Tβ4 mRNA の発現局在

A, C, E, G: Tβ10 mRNA 発現。B, D, F, H: Tβ4 mRNA 発現。A, C: 帽状期において、Tβ10 mRNA の発現は外エナメル上皮(矢印)と歯乳頭細胞(米印)に強く認められた。B, D: Tβ4 mRNA の発現は E14.5 において外エナメル上皮(矢印)と PEK(矢頭)に認められたが、E15.5 になると PEK での発現が減弱した。E, G: 鐘状期前期では Tβ10 mRNA の発現は内エナメル上皮(矢頭)と将来咬頭部となる部位の歯乳頭細胞(米印)に認められた。F, G: Tβ4 mRNA の発現は歯堤部(矢印)、内エナメル上皮(矢頭)および血管内皮細胞(小矢印)に認められた。

scale bars: 100μm

鐘状期後期 (P0-P1)

この時期の歯胚では、内エナメル上皮に接する歯乳頭細胞が象牙芽細胞に分化していた。P0 ではエナメル質、象牙質の基質形成は認められず、P1 になると舌側咬頭頂部において基質形成が認められた。

T β 10 mRNA は、P0 において内エナメル上皮と舌側咬頭部の前象牙芽細胞に発現が認められた (Fig. 7A)。T β 4 mRNA 発現は、P0 において内エナメル上皮に著明に認められ、外エナメル上皮にもわずかに認められた (Fig. 7B)。P1 では、T β 10 mRNA の著明な発現が頬側咬頭の基質形成前の象牙芽細胞と咬合面裂溝相当部の前象牙芽細胞に認められた (Fig. 7C, F, G, L, M)。さらには頬側咬頭の象牙芽細胞や咬合面裂溝相当部の前象牙芽細胞に面した前エナメル芽細胞やエナメル芽細胞にも T β 10 の強い発現が認められた (Fig. 7F, G)。一方で、基質を形成している舌側咬頭の象牙芽細胞とエナメル芽細胞では T β 10 mRNA の発現が減弱していた (Fig. 7E, K)。T β 4 mRNA の発現は P1 において T β 10 mRNA が発現している前エナメル芽細胞に著明に認められたが、基質を形成している舌側咬頭のエナメル芽細胞での発現は減弱していた。象牙芽細胞には T β 4 mRNA の発現が認められなかった (Fig. 7D, H-M)。

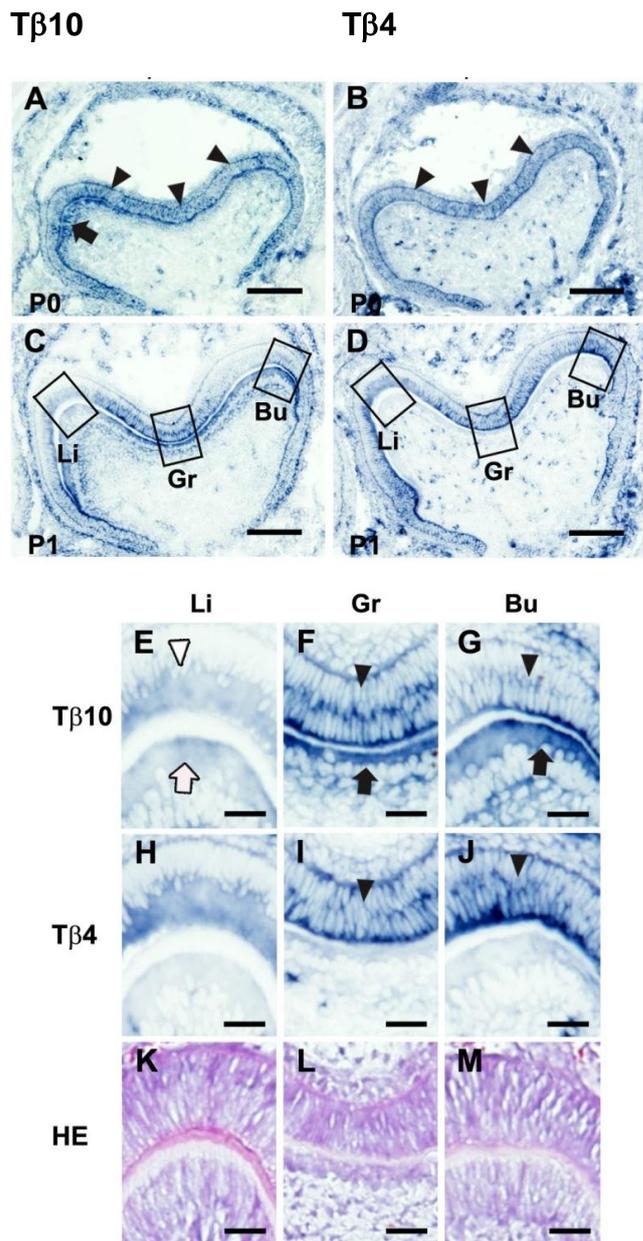


Fig. 7 出生直後のマウス歯胚における Tβ10 と Tβ4 mRNA の発現局在

A, C, E, F, G: Tβ10 mRNA 発現。 B, D, H, I, J: Tβ4 mRNA 発現。 K-L: HE 染色

A: 出生時、Tβ10 は内エナメル上皮(矢頭)と前象牙芽細胞(矢印)に発現が認められた。 B: Tβ4 は内エナメル上皮(矢頭)にのみ mRNA が検出された。 C, F, G: P1 において、Tβ10 は基質形成前の象牙芽細胞や前象牙芽細胞(黒矢印)、基質形成前の前エナメル芽細胞やエナメル芽細胞(黒矢頭)に強い発現が認められた。 C, E: 基質を形成した象牙芽細胞(白矢印)とエナメル芽細胞(白矢頭)で発現が減弱した。 D, I, J: Tβ4 は P1 の前エナメル芽細胞(黒矢頭)に限局して発現が認められた。 Li: 舌側咬頭、Gr: 咬合面裂溝、Bu: 頬側咬頭。 A-D: scale bars: 100μm, E-M: scale bars: 10μm

歯冠部基質形成期 (P2-P3)

この時期になるとエナメル質基質の形成は終了し、内外エナメル上皮はさらに間葉組織に陥入してヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) の形成が開始されていた。また、象牙質基質の形成は出生直後と比較してさらに進んでいた。

P2 において T β 10 mRNA は歯乳頭の側面部に強く観察され、咬頭部や咬合面裂溝の象牙芽細胞では減弱していた。また、エナメル器側方部前エナメル芽細胞においても T β 10 mRNA の著明な発現が認められた。その結果、歯胚側方部において互いに向かい合っている前エナメル芽細胞と前象牙芽細胞に T β 10 mRNA 発現が認められた (Fig. 8A)。T β 4 mRNA の発現は P2 において側方の前エナメル芽細胞に認められた (Fig. 8B)。

P3 になると、T β 10 や T β 4 mRNA の発現は限局して認められた。T β 10 mRNA が発現している前エナメル芽細胞は内エナメル上皮の両側端に存在し、それに面している歯乳頭領域の前象牙芽細胞にも T β 10 mRNA の強い発現が認められた (Fig. 8C)。一方、T β 4 mRNA の発現は内エナメル上皮の側方末端の前エナメル芽細胞にのみ著明に認められ、象牙芽細胞および前象牙芽細胞では検出されなかった (Fig. 8D)。

Tβ10

Tβ4

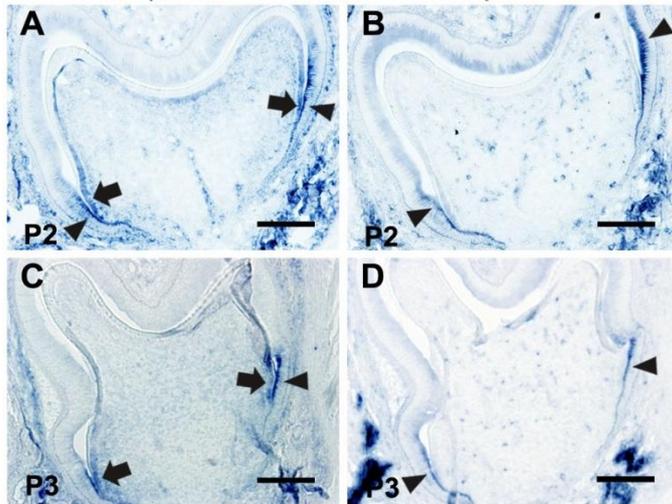


Fig. 8 出生後のマウス歯胚における Tβ10 と Tβ4 mRNA の発現局在

A, C: Tβ10 mRNA 発現。基質形成期において、Tβ10 mRNA の発現は基質形成前の前象牙芽細胞(矢印)、前エナメル芽細胞(矢頭)に強く認められた。B, D: Tβ4 mRNA 発現。Tβ4 mRNA の発現も基質形成期の前エナメル芽細胞(矢頭)に限局して認められた。 scale bars: 100μm

歯根形成期 (P5-P7)

歯冠部の形成はほぼ終了し、HERS による間葉系細胞の誘導が開始されていた。T β 10 mRNA の発現は歯乳頭組織の側方にある前象牙芽細胞に強く認められた (Fig. 9B, E)。HE 染色を施した連続切片で詳細を確認すると、前象牙芽細胞に T β 10 mRNA が発現していた (Fig. 10)。また、HERS とその周囲の間葉系細胞にも T β 10 mRNA の発現が認められた。HERS を拡大して観察すると、内側の細胞よりも外側の細胞で T β 10 mRNA の発現が強いことが確認できた。T β 4 mRNA の発現はエナメル芽細胞においてほぼ消失しており、それ以外の部分でも認められなかった (Fig. 9C, F)。

歯根完成期 (P14)

歯根形態形成完了間近の像が確認できた。T β 10 mRNA の発現は HERS とその周囲の間葉組織のみに認められた (Fig. 9H)。T β 10 mRNA が発現している間葉系細胞は歯髄側の細胞のみならず、歯根膜側の細胞にも認められた。歯冠部および歯根部に T β 4 mRNA の発現は認められなかった (Fig. 9I)。

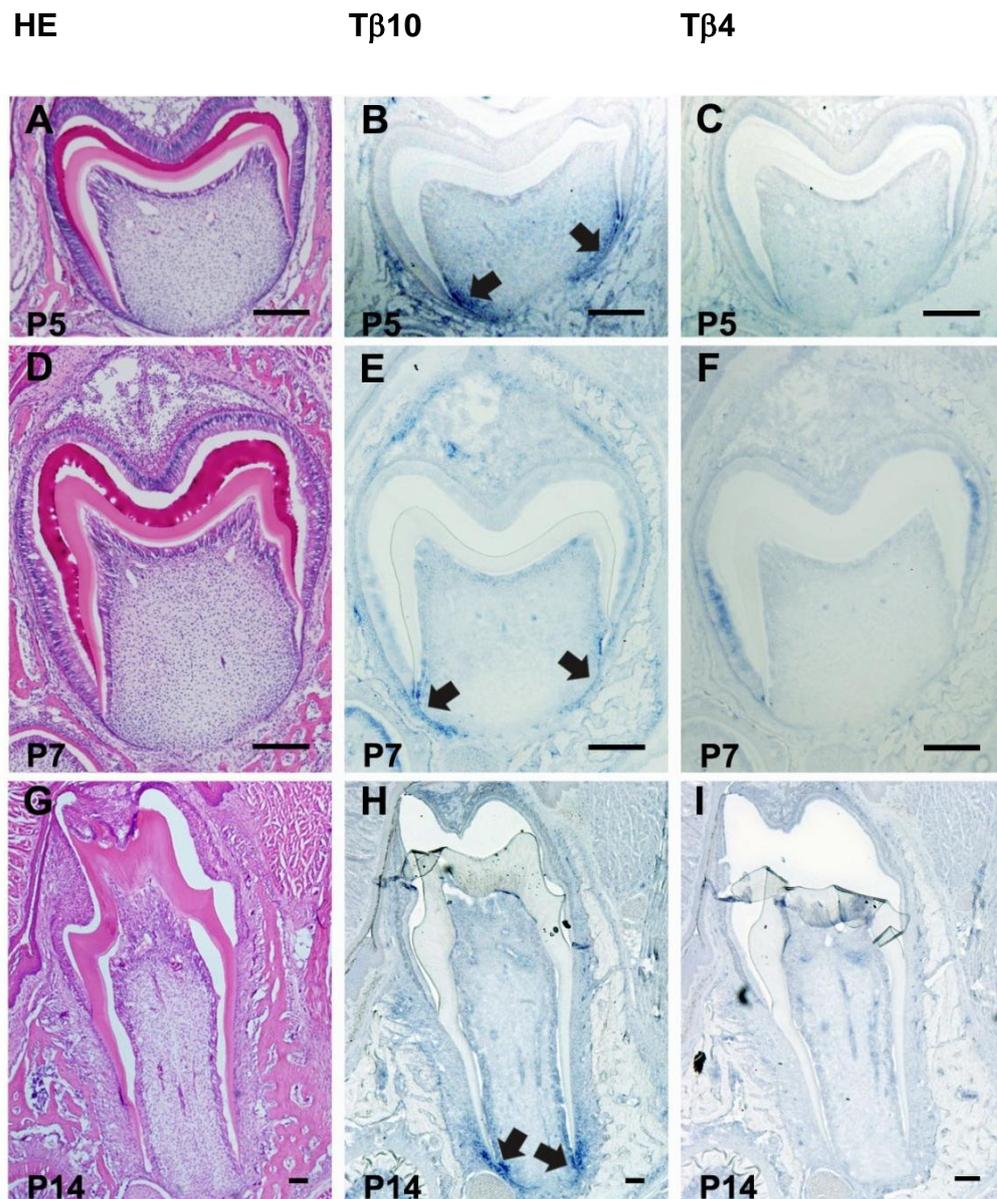


Fig. 9 歯根形成期マウス歯胚における Tβ10 と Tβ4 mRNA の発現局在

A, D, G: P5、P7 および P14 歯胚の HE 染色組織像。B, E, H: Tβ10 mRNA 発現。歯根形成期において、Tβ10 mRNA の発現は HERS やその周囲の間葉系細胞に限局して認められた(矢印)。C, F, I: Tβ4 mRNA 発現。Tβ4 mRNA の発現はエナメル芽細胞、象牙芽細胞のいずれにおいてもほとんど認められなかった。A-F: scale bars: 100μm, G-I: scale bars: 50μm

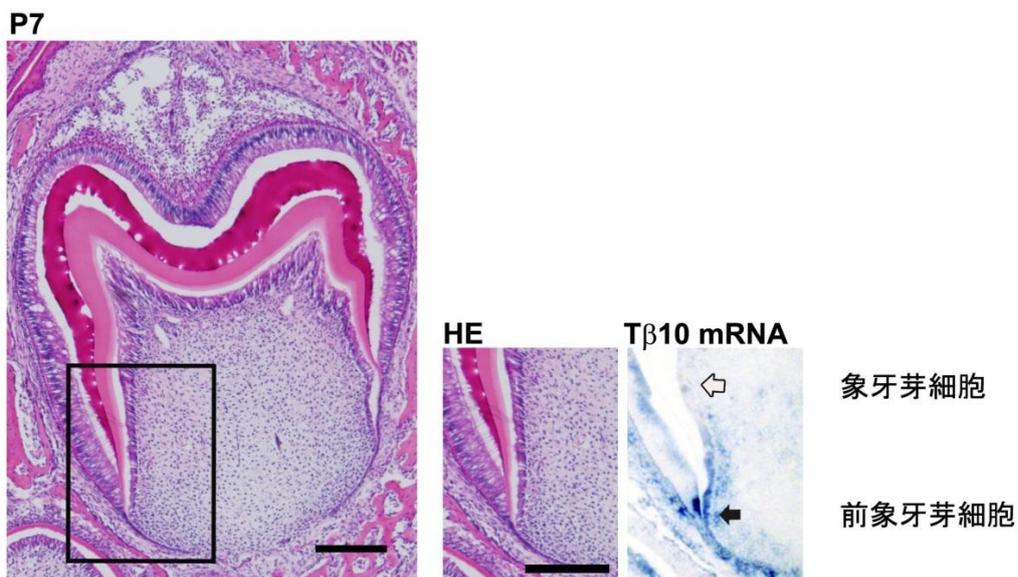
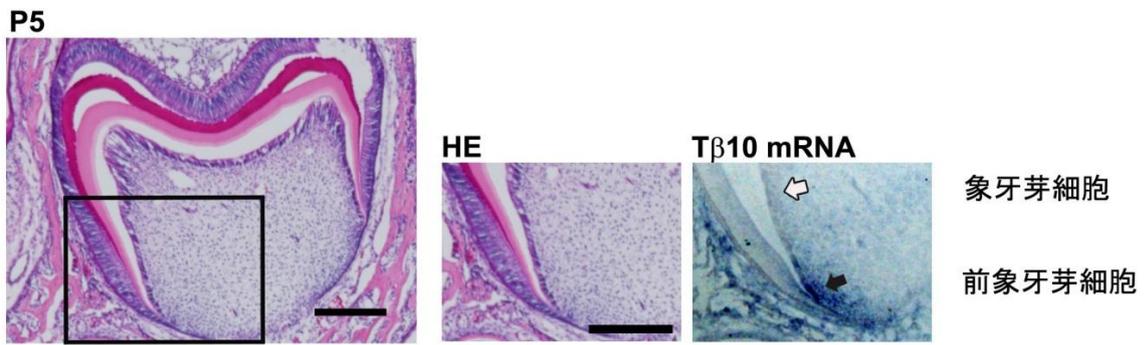


Fig. 10 P5 と P7 マウス歯胚における Tβ10 mRNA の発現局在

歯根形成期において Tβ10 mRNA は前象牙芽細胞に認められ(黒矢印)、基質形成後の象牙芽細胞には検出されなかった(白矢印)。また、HERS やその周囲の間葉系細胞にも Tβ10 mRNA の発現が認められた。HERS において、Tβ10 mRNA の発現は内側の細胞よりも外側の細胞で強く認められた。 scale bars: 100μm

c) マウス歯胚形成期における Tβ10 と Tβ4 の mRNA 定量解析

下顎において、Tβ10 と Tβ4 mRNA の発現量は E10.5 よりも E12.0 で有意に増加した。歯胚において、帽状期である E15.0 と比較して鐘状期前期である E18.0 で Tβ10 mRNA 発現量が一時的に減少した。また、基質形成・分泌期の初期である P1 では再度発現量が増加したが、P5 で再び減少した。同様の増減が Tβ4 mRNA でも認められた。

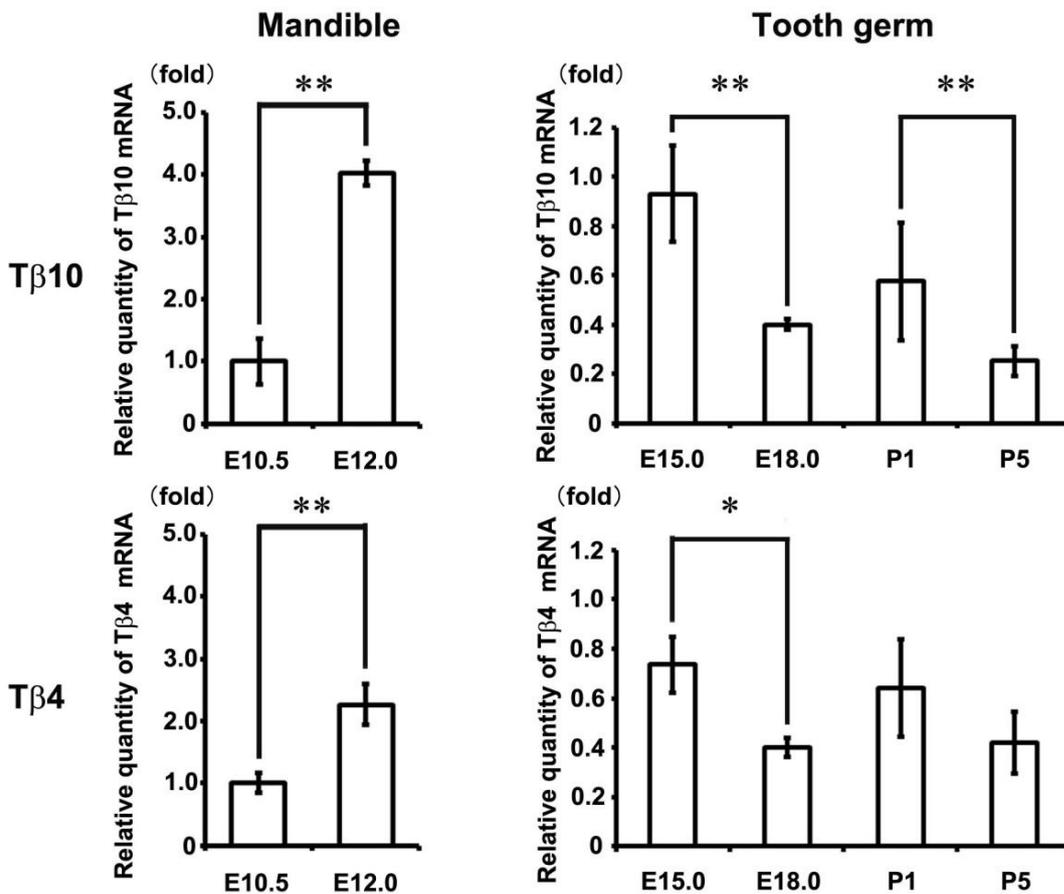


Fig. 11 マウス歯胚形成期における Tβ10 と Tβ4 の mRNA 定量解析

Tβ10、Tβ4 とともに下顎では E12.0、歯胚では E15.0 と P1 において mRNA 発現量が増加した。
(*: P<0.05, **: P<0.01)

d) マウス胎生期の各臓器における T β 10 と T β 4 の mRNA 発現局在

E14.0 の脳において、T β 10 mRNA の発現は発生途中の大脳半球周囲の間葉組織に著明に認められたのに対し、T β 4 mRNA の発現は大脳半球の神経上皮細胞層に認められた。また、E14.0 の眼において、T β 10、T β 4 の mRNA 発現はともに発生途中の網膜内側に認められた。P1 の涙腺や E18.0 の唾液腺においても、T β 10、T β 4 の mRNA 発現はともに腺房細胞で認められ、唾液腺では導管部でも認められた。P1 の毛包では、T β 10 mRNA の発現が毛包周囲の間葉組織に認められたのに対し、T β 4 mRNA の発現は毛包を構成する上皮細胞に認められた (Fig. 12A)。

さらに、E18.0 の各臓器において T β 10 と T β 4 の mRNA 発現が認められた。胸腺、脾臓、肺、心臓および肝臓では、T β 10 と T β 4 の mRNA 発現部位が一致していた (Fig. 12B)。

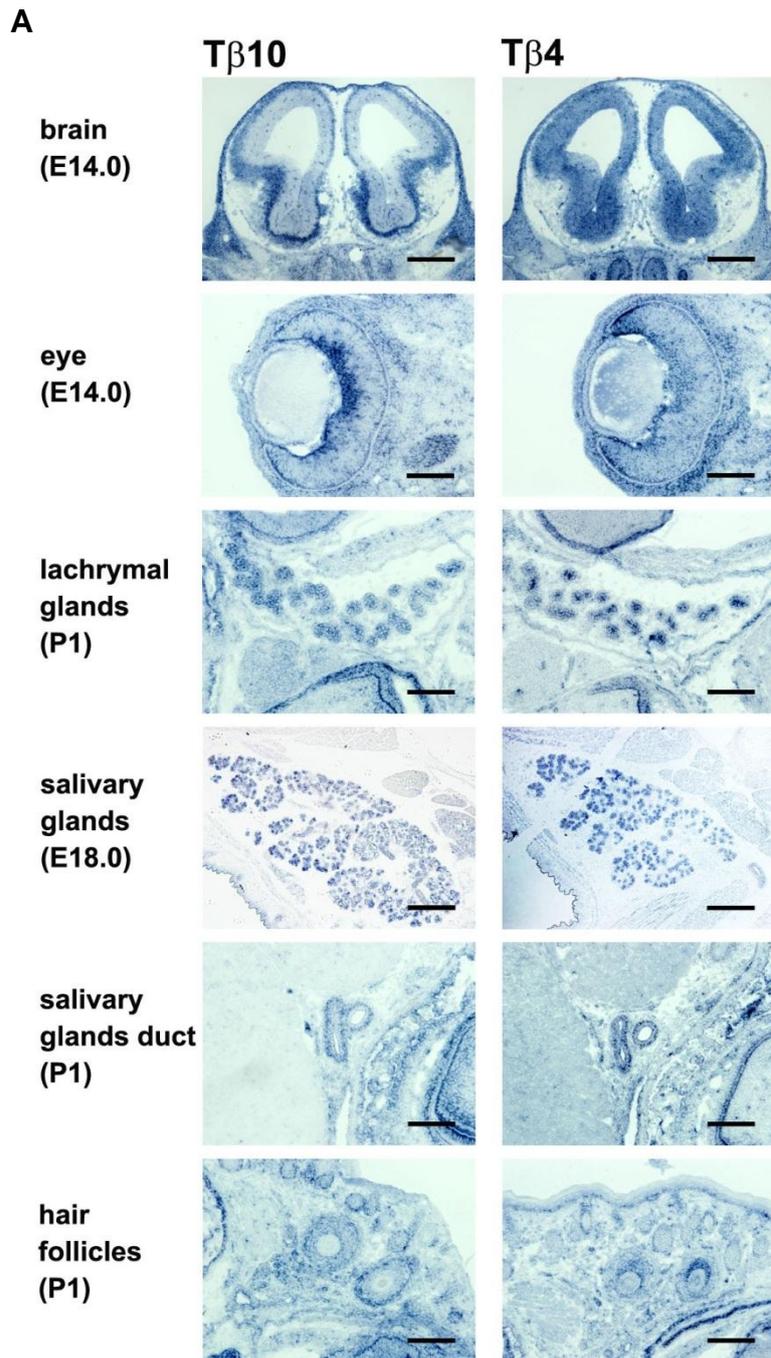


Fig. 12A 胎生期マウスの各臓器における Tβ10 と Tβ4 の mRNA 発現局在

Tβ10 mRNA の発現は脳の大脳半球周囲の間葉組織、眼の網膜内側、涙腺・唾液腺の腺房細胞や導管、毛包周囲の間葉組織に認められた。Tβ4 mRNA の発現は脳の大脳半球の神経上皮細胞層、眼の網膜内側、涙腺・唾液腺の腺房細胞や導管部、毛包を構成する上皮細胞で認められた。brain: scale bars: 150μm, eye, lachrymal glands, salivary glands, hair follicles: scale bars: 50μm

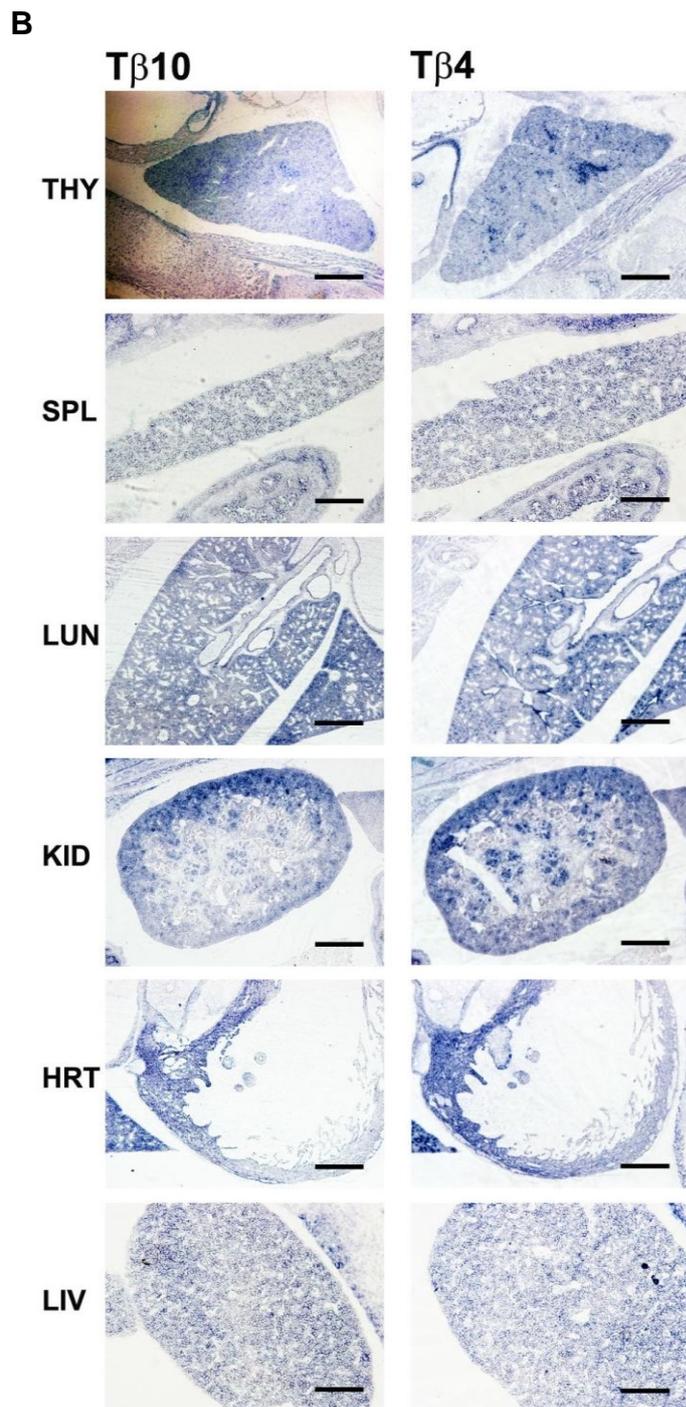


Fig. 12B 胎生期マウスの各臓器における Tβ10 と Tβ4 の mRNA 発現局在

Tβ10、Tβ4 の mRNA 発現はともに胸腺、脾臓、肺、腎臓、心臓、肝臓に認められた。

THY: thymus, SPL: spleen, LUN: lung, KID: kidney, HRT: heart, LIV: liver,
scale bars: 50μm

e) マウス胎生期と生後の各臓器における T β 10 と T β 4 の mRNA 定量解析

脳、胸腺、脾臓、肺、膵臓、腎臓、心臓、肝臓における T β 10 と T β 4 の mRNA 発現量を胎生期 (E18.0) と生後 (P14) で比較した。

脳、脾臓、腎臓、心臓、肝臓では、出生後よりも胎生期において T β 10 mRNA 発現量が有意に高値を示した。また、胎生期における各臓器の発現量と歯胚の発現量を比較すると、脳、脾臓、肺以外の臓器において、歯胚よりも T β 10 mRNA 発現量が低値であった。一方、T β 4 mRNA は出生後に発現量が増加する臓器が認められ、胎生期に発現量が有意に高値を示したのは、脳と心臓だけであった (Fig. 13)。

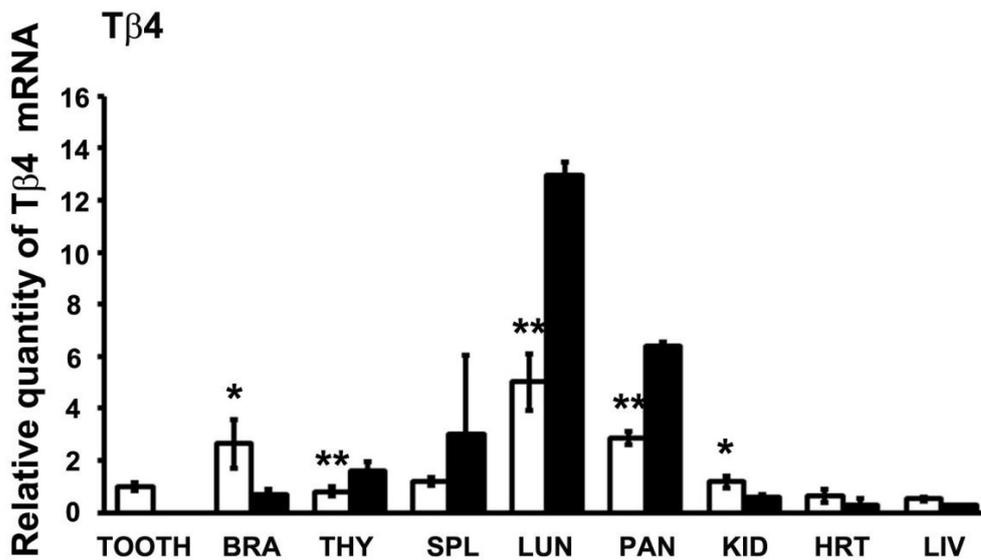
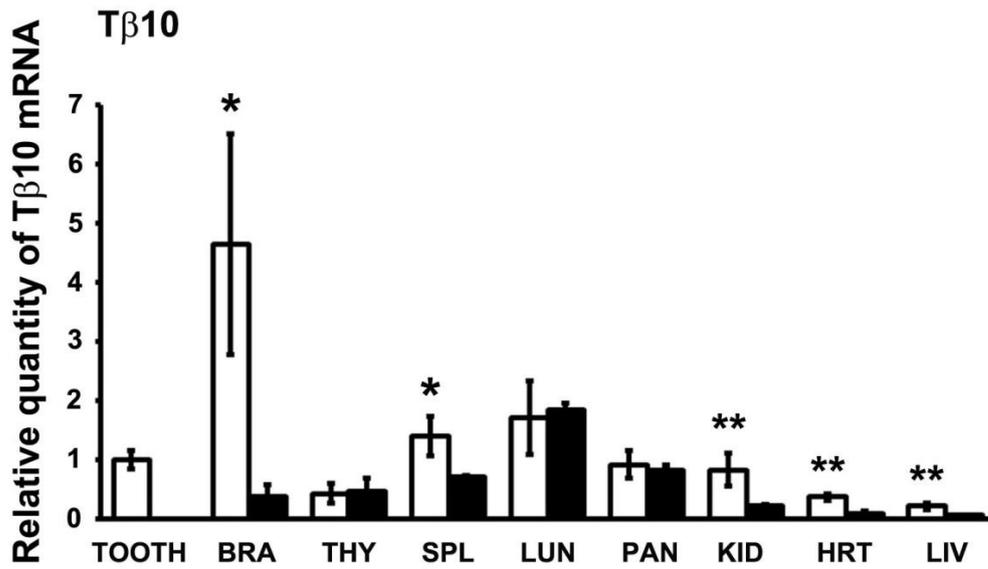


Fig. 13 マウス胎生期と生後の各臓器における Tβ10 と Tβ4 の mRNA 定量解析

脳・脾臓・腎臓・心臓・肝臓では出生後よりも胎生期において Tβ10 mRNA が有意に高値を示した。また、胎生期では、脳・脾臓・肺以外の臓器よりも歯胚において Tβ10 mRNA が高値であった。一方、Tβ4 mRNA は胎生期より生後に高値を示す臓器が認められた。

□: E18.0, ■: P14, BRA: brain, THY: thymus, SPL: spleen, LUN: lung, PAN: pancreas, KID: kidney, HRT: heart, LIV: liver (*: P<0.05, **: P<0.01)

4-2: 機能解析

a) 器官培養下における siRNA による T β 10 発現抑制効果

発現様式解析の結果より、T β 10 が歯胚の形態形成や歯原性細胞の分化に関与していることが、示唆された。次に器官培養下における T β 10 遺伝子の機能阻害実験を行った。まず、siRNA を用いて E10.5 下顎と E15.0 歯胚における T β 10 の発現抑制を行い、その抑制効果を Real-time PCR 法にて検討した。その結果、下顎と歯胚ともに T β 10 siRNA 群では Ut 群や Cont 群と比較して有意な T β 10 mRNA の発現抑制が認められた。

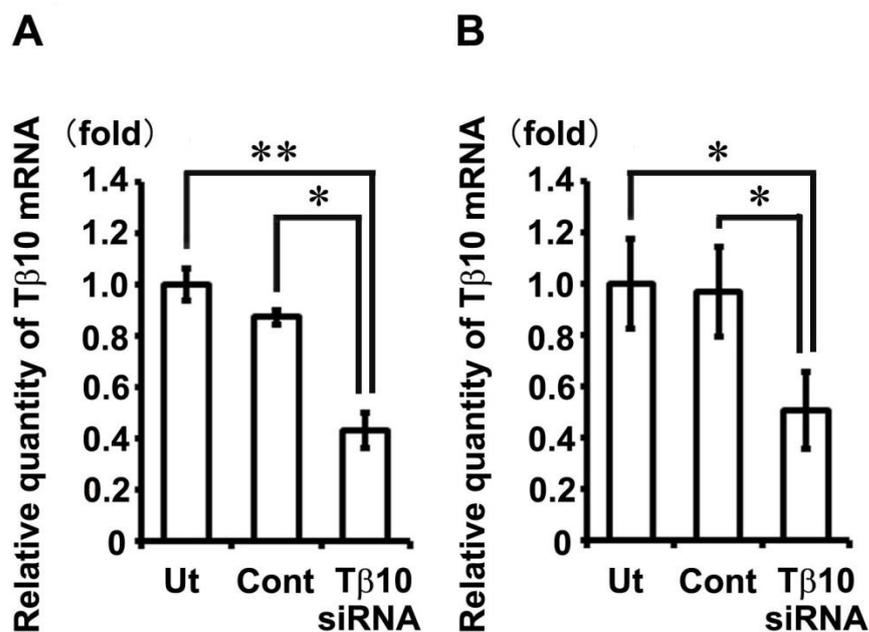


Fig. 14 器官培養下における siRNA による T β 10 発現抑制効果

A: E11.0 下顎を 8 日間培養後 Real-time PCR 法により T β 10 mRNA の定量解析を行った結果。
B: E15.0 歯胚を 8 日間培養後 Real-time PCR 法により T β 10 mRNA の定量解析を行った結果。
下顎と歯胚ともに T β 10 siRNA 群では Ut 群や Cont 群と比較して有意に T β 10 mRNA 発現抑制が認められた。(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

b) 器官培養下 Tβ10 機能抑制による E11.0 下顎の組織形態の変化

E11.0 下顎の器官培養 8 日経過後の Ut 群や Cont 群において、歯胚上皮は帽状を呈し PEK の発現が確認できた。また、エナメル器周囲に間葉系細胞の凝集が観察され、歯乳頭と歯小囊の形成が認められた。一方、Tβ10 siRNA 群では、エナメル器の形成は認められず、陥入上皮は蕾状を呈していた。蕾状期歯胚の周囲に間葉系細胞の凝集は認められなかった (Fig. 15)。これらの組織形態学的変化の結果をまとめて、歯胚の分化段階によって評価すると、Tβ10 siRNA 群において帽状期へ発育したのはわずか 16.7%であった。一方、Ut 群や Cont 群において帽状期への発育が認められたのは、それぞれ 87.5%と 88.9%であった (Table 1)。

Table 1 Tβ10 抑制下で E11.0 下顎を 8 日間培養後の歯胚発育状態

	Treatment (number of explants)		
	Ut	Cont	Tβ10 siRNA **
Bud stage	1	1	10
Cap stage	7	8	2

(** : P<0.01)

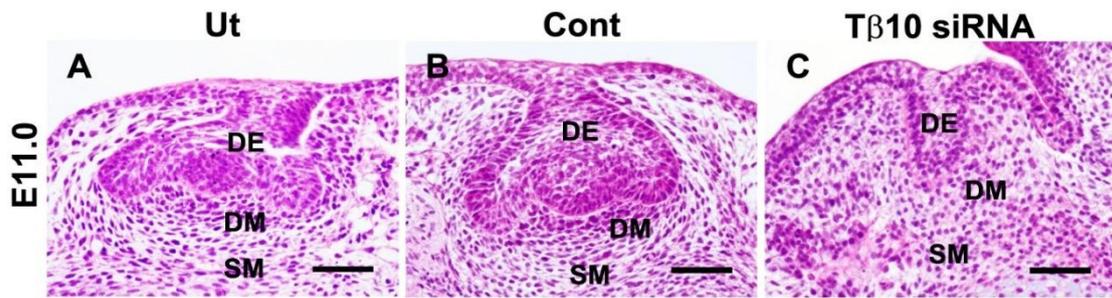


Fig. 15 器官培養下 T β 10 発現抑制による E11.0 下顎の組織形態の変化

E11.0 下顎を 8 日間培養後の HE 染色像。A, B: Ut 群や Cont 群において、上皮は帽状を呈し PEK の発現が確認できた。また、エナメル器周囲に間葉系細胞の凝集が認められ、歯乳頭、歯小囊の形成が認められた。C: T β 10 siRNA 群では、上皮が蓄状を呈しており、歯蕾周囲に間葉系細胞の凝集は認められなかった。 scale bars: 100 μ m

c) 器官培養下 T β 10 発現抑制による E11.0 下顎の細胞増殖への影響

次に、T β 10 が細胞増殖活性に関与しているかを確認するために、培養した E11.0 下顎を用いて Ki67 免疫組織染色を行った。その結果、Cont 群の歯胚において、陽性細胞は PEK に認められなかったが、エナメル器のその他の部位や間葉組織において散在性に認められた。一方、T β 10 siRNA 群の歯胚においては、陽性細胞の局在に偏りはなく、全体的に点在していた (Fig. 16A)。また、T β 10 siRNA 群における歯原性間葉細胞や歯胚周囲の間葉系細胞の増殖は Cont 群と比較して有意に抑制され、上皮細胞においても T β 10 siRNA 群における Ki67 陽性細胞数が Cont 群と比較して有意に減少した (Fig. 16B)。

d) 器官培養下 T β 10 発現抑制による E11.0 下顎のアポトーシスへの影響

次に、TUNEL 法を用いて T β 10 発現抑制による歯胚細胞のアポトーシスへの影響を調べた。これまでの報告と同様に、Cont 群の歯胚上皮では TUNEL 陽性細胞が PEK に特に多く認められ、間葉系細胞では散在性に認められた。一方、T β 10 siRNA 群では上皮と間葉ともに散在性に TUNEL 陽性細胞が認められた (Fig. 16C)。T β 10 siRNA 群、Ut 群および Cont 群の TUNEL 陽性細胞比率には、全ての領域において差が認められなかった (Fig. 16D)。これより、T β 10 siRNA による歯胚の形態形成抑制は歯原性間葉細胞におけるアポトーシス発生の上昇ではなく細胞増殖抑制によるものであると考えられた。

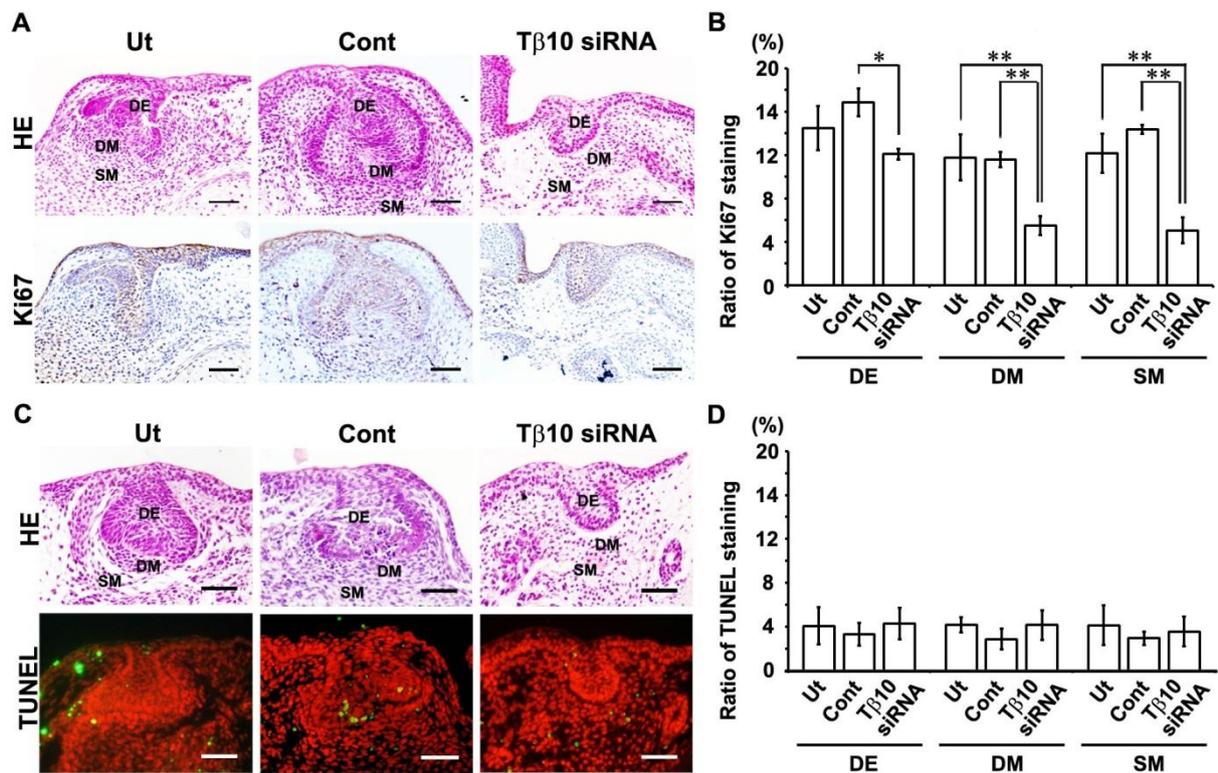


Fig. 16 器官培養下 Tβ10 発現抑制による E11.0 下顎の細胞増殖と細胞死への影響

A: 8日間培養した E11.0 下顎の HE 染色像と Ki67 免疫組織染色像。B: Ki67 陽性細胞率。C: 8日間培養した E11.0 下顎の HE 染色像と TUNEL 法による蛍光染色像。D: TUNEL 陽性細胞率。歯間葉(dental mesenchyme, DM)、歯胚周囲間葉組織(surrounding mesenchyme, SM)領域において、Tβ10 siRNA 群の Ki67 陽性細胞率は Ut 群や Cont 群と比較して有意に低下した。歯胚上皮(dental epithelium, DE)においても低下が認められた。また、Tβ10 siRNA 群、Ut 群および Cont 群の TUNEL 陽性細胞比率は、全ての領域において差が認められなかった。scale bars: 100μm, (*: P<0.05, **: P<0.01)

e) 器官培養下 Tβ10 発現抑制による E15.0 歯胚の組織形態の変化

E15.0 歯胚の器官培養 8 日目の Ut 群や Cont 群において、エナメル器は鍾状を呈していた (Fig. 17A, B)。エナメル芽細胞や象牙芽細胞の分化が認められ、象牙前質が観察された (Fig. 17D, E)。一方、Tβ10 siRNA 群の歯胚では、エナメル上皮の歯乳頭方向への伸長が認められず、歯冠形態は鍾状を呈していなかった (Fig. 17C)。しかしながら、エナメル芽細胞や象牙芽細胞の分化は Cont 群と同様に認められた (Fig. 17F)。

これらの組織形態学的変化の結果をまとめて評価すると、Ut 群や Cont 群において歯胚が鐘状期へ発育したのは、それぞれ 100%と 99.9%であった。一方、Tβ10 siRNA 群において歯胚が鍾状を呈したのは 56.2%であり、Ut 群や Cont 群と比較して有意な形態形成不良が認められた (Table 2)。

Table 2 Tβ10 抑制下で E15.0 歯胚を 8 日間培養後の歯胚発育状態

		Treatment (number of explants)		
		Ut	Cont	Tβ10 siRNA *
Bell stage	-	0	1	7
	+	7	14	9

(*: P<0.05)

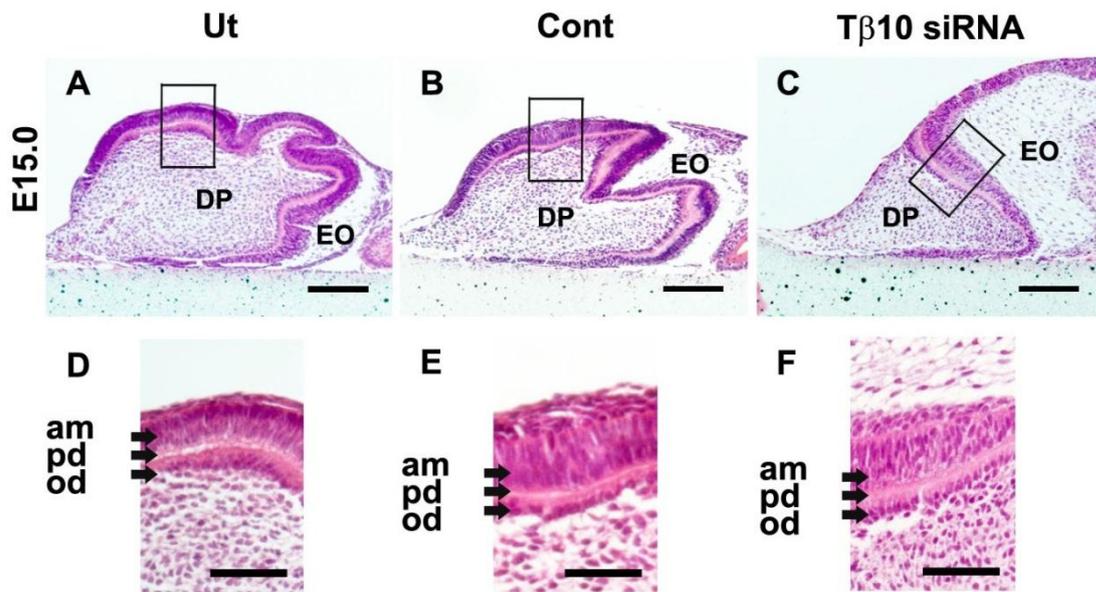


Fig. 17 器官培養下 T β 10 発現抑制による E15.0 歯胚の組織形態の変化

A, B: Ut 群や Cont 群において、エナメル器は鐘状を呈していた。C: 一方、T β 10 siRNA 群では、エナメル上皮の歯乳頭組織方向への伸長が認められず、歯冠形態は鐘状を呈していなかった。D, E, F: エナメル芽細胞や象牙芽細胞の分化に関して、Cont 群と T β 10 siRNA 群には明らかな差が認められなかった。A-C: scale bars: 100 μ m, D-F: scale bars: 50 μ m

f) 器官培養下 T β 10 機能抑制による E15.0 歯胚の細胞増殖への影響

培養した E15.0 歯胚を用いて Ki67 免疫組織染色を行い、細胞増殖への影響を検討した。Ut 群や Cont 群において、歯胚側方のエナメル上皮に陽性細胞が多く認められるのに対し、T β 10 siRNA 群ではエナメル上皮に陽性細胞が認められなかった (Fig. 18A)。これより、上皮細胞では T β 10 siRNA 群における細胞増殖活性の有意な低下が認められた。歯乳頭組織においても、T β 10 siRNA 群の陽性細胞比率は Ut 群や Cont 群と比較して有意に低下した (Fig. 18B)。

g) 器官培養下 T β 10 発現抑制による E15.0 歯胚のアポトーシスへの影響

全ての群の TUNEL 陽性細胞は、歯原性上皮細胞や間葉系細胞において散在性に認められた (Fig. 18C)。T β 10 siRNA 群、Ut 群および Cont 群の歯胚における TUNEL 陽性細胞比率は、全ての領域において差が認められなかった (Fig. 18D)。

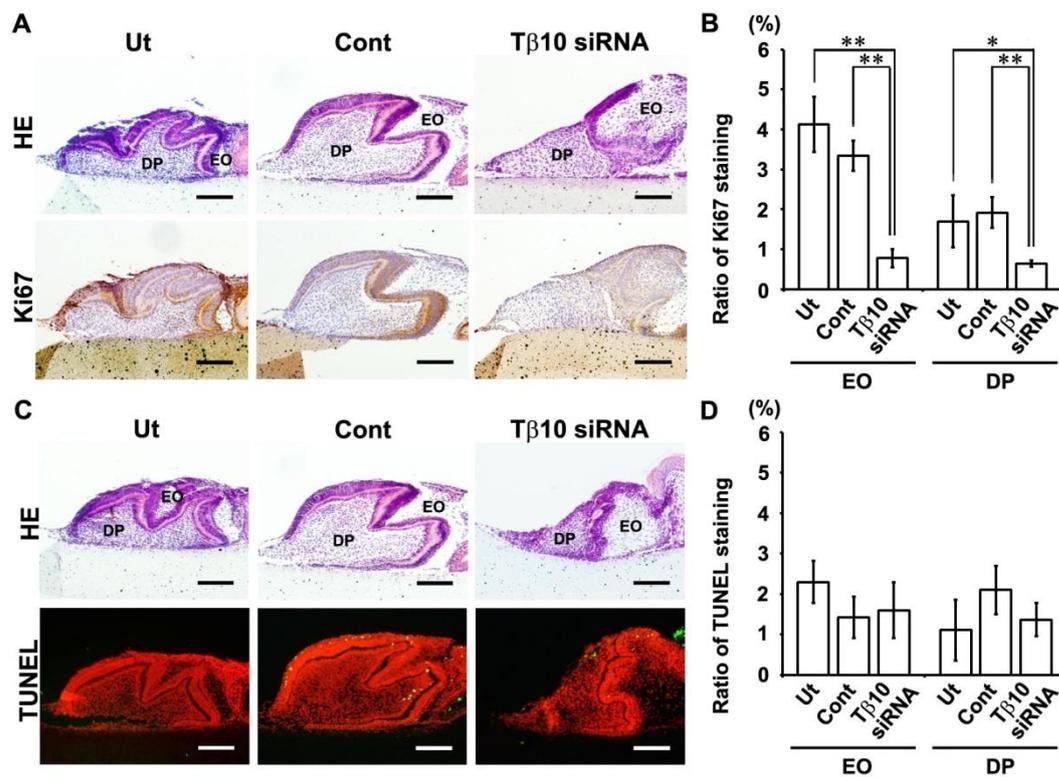


Fig. 18 器官培養下 Tβ10 発現抑制による E15.0 歯胚の細胞増殖と細胞死への影響

A: 8日間培養した E15.0 歯胚の Ki67 免疫組織染色像。B: Ki67 陽性細胞率。C: 8日間培養した E15.0 歯胚の TUNEL 法による蛍光染色像。D: TUNEL 陽性細胞率。エナメル器 (enamel organ, EO)、歯乳頭 (dental papilla, DP) 領域において、Tβ10 siRNA 群の Ki67 陽性細胞率は Ut 群や Cont 群と比較して有意に低下した。TUNEL 法では、Tβ10 siRNA 群、Ut 群および Cont 群の TUNEL 陽性細胞比率は、両領域において差が認められなかった。scale bars: 100μm, (*: P<0.05, **: P<0.01)

h) 細胞培養下における siRNA による T β 10 発現抑制効果

mDP 細胞と mDE6 細胞を用いて T β 10 siRNA による T β 10 発現抑制効果を Real-time PCR 法にて検索した。T β 10 siRNA 群では、Ut 群や Cont 群と比較すると T β 10 mRNA 発現量が 50%以上抑制された (Fig. 19A, C)。

i) T β 10 発現抑制による歯原性細胞増殖への影響

T β 10 機能抑制下における mDP 細胞と mDE6 細胞の細胞増殖活性を調べた。培養 24hrs、48hrs 後において、両細胞ともに、T β 10 siRNA 群の細胞数は、Ut 群や Cont 群と比較して有意に低下した。Ut 群と Cont 群には有意な差が認められなかった (Fig. 19B, D)。これより、T β 10 は歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞の細胞増殖活性を抑制するということが示唆された。

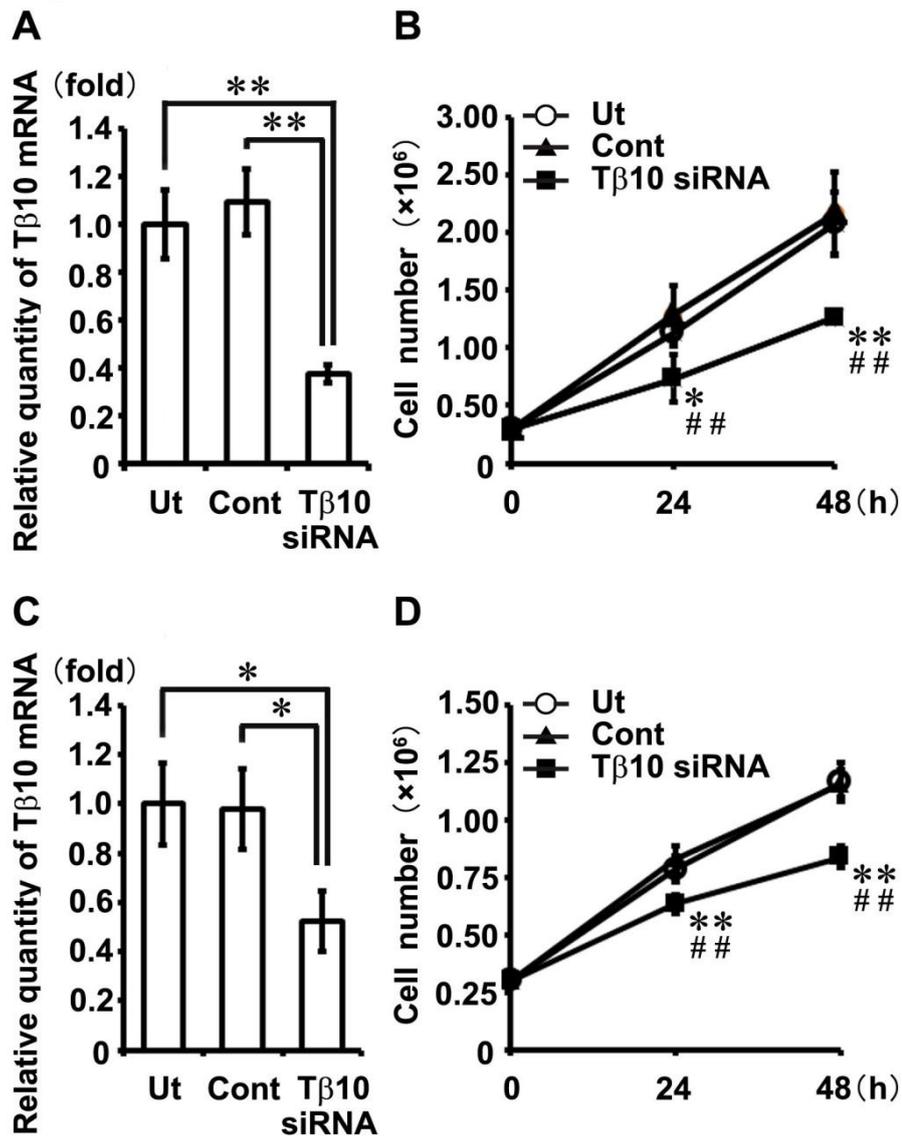


Fig. 19 細胞培養下 Tβ10 発現抑制による歯原性細胞増殖への影響

A: Real-time PCR 法を用いて mDP 細胞の Tβ10 mRNA の定量解析を行った結果。
 B: Tβ10 発現抑制下における mDP 細胞の細胞増殖活性。C: Real-time PCR 法を用いて mDE6 細胞の Tβ10 mRNA の定量解析を行った結果。D: Tβ10 発現抑制下による mDE6 細胞の細胞増殖活性。両細胞において、Tβ10 siRNA 群の細胞数は、Ut 群や Cont 群と比較して有意に低下した。A, C: (*: P<0.05, **: P<0.01), B, D: ▲: Cont 群、○: Ut 群、■: Tβ10 siRNA 群。(Tβ10 siRNA 群と Ut 群の比較 *: P<0.05, **: P<0.01)(Tβ10 siRNA 群と Cont 群の比較 #: P<0.05, ##: P<0.01)

5. 考 察

本研究室では、Thymosin beta family に属し T β 10 と高相同性を有する T β 4 が、歯胚の形態形成に関与していることを報告してきた (Akhter et al., 2005; Ookuma et al., 2012)。その際、E15.5 歯胚において、T β 4 が主に上皮由来の組織に発現するのに対し、T β 10 は間葉由来の歯乳頭組織に発現することを見出した (Akhter et al., 2005)。これまでに、胎生期の様々な組織において T β 10 の高発現が報告されているが (Gerosa et al., 2010; Daniela et al., 2011; Sonia et al., 2009; Lin et al., 1990)、歯胚形成期における T β 10 の発現様式については未だ報告がない。本研究では、歯胚形成過程におけるマウス下顎第一臼歯の T β 10 の経時的な発現様式について検索し、T β 4 の発現と比較検討した。そして、T β 10 が歯胚の発育、形態形成および歯原性細胞の分化に関与していることを証明した。

本研究の結果から、胎生期における T β 10 発現局在が T β 4 とは全く異なることが解明された。T β 10 が主に歯原性上皮細胞や歯乳頭細胞を含む歯原性間葉細胞に発現が認められたのに対し、T β 4 は主に歯原性上皮細胞に発現が認められた。Carpintero (1996) らは、T β 10 が E9.5 マウスの上下顎の間葉組織に発現することを報告している。この報告結果は、本研究において E10.5 下顎の間葉組織に T β 10 が検出された結果と一致している。また、T β 10 が発育過程における腎組織や唾液腺組織の腺房や導管上皮細胞にも発現するという報告がある (Gerosa et al., 2010; Fanni et al., 2011)。本研究では、腎や唾液腺を含む様々な臓器や器官にて T β 10 の発現が認められ、それらの発現量はこれまでの報告と同様に出生後よりも胎生期にて高値を示した。これより、T β 10 は胎生期における器官の発生発育に関与していることが考えられた。また、胎生期における様々な臓器の T β 10 発現量と比較して、歯胚の T β 10 発現量は高値であったことより、

Tβ10 が歯胚の発育や形成においても、歯原性細胞の増殖に関与している事が示唆された。

また、E11.0 下顎の器官培養による Tβ10 機能阻害実験では、Tβ10 siRNA 群の歯胚に発育遅延が認められた。Tβ10 は、細胞増殖活性の制御 (Santelli et al., 2002) や、アポトーシスの制御 (Davies et al., 2011; Gourlay et al., 2006; Lee et al., 2001) を行う機能を有しており、これまでに様々な報告がされている。本研究では、歯胚発育遅延の原因が細胞増殖活性の低下もしくは細胞死の増加であると考え、それらを免疫染色法により検討した。その結果、Tβ10 siRNA 群において、歯原性細胞の Ki67 陽性細胞比率は Cont 群と比較して有意に減少していることが示された。一方、TUNEL 陽性細胞比率には差が認められなかった。また mDP 細胞を用いた実験においても、Tβ10 siRNA 群の細胞数は Cont 群よりも有意に減少した。これより、E11.0 歯胚の発育遅延は細胞死の増加よりも細胞増殖活性の低下によって引き起こされるものであることが示唆された。以上より、Tβ10 が歯胚形成過程の歯原性細胞の増殖において、重要な役割を担っている事が示唆された。これらを考慮すると、帽状期における Tβ10 mRNA の外エナメル上皮での発現 (Fig. 6) と、これまでに報告されている E15.5 歯胚における BrdU 免疫組織染色の陽性細胞発現部位 (Shigemura et al., 1999) が一致することにも説明がつく。つまり、同部位における Tβ10 発現は細胞増殖を活性化させるものだと推測できた。

さらに、E15.0 歯胚の器官培養では、Tβ10 siRNA 群の歯胚においてエナメル器先端部の成長不良とそれに伴う歯胚全体の形態形成不良が認められた。しかしながら、E11.0 下顎器官培養と同様に、E15.0 歯胚器官培養の Tβ10 siRNA 群と Cont 群の歯胚における TUNEL 陽性細胞比率には差が認められなかった。一方、Tβ10 siRNA 群の Ki67 陽性細胞比率では有意な低下が認められた。これより、E15.0 歯胚の形態形成不良は、歯原性上皮、特に歯胚側方のエナメル上皮

の細胞増殖活性低下によって歯胚の外形が形成されず、それに伴い間葉組織の成長不良も生じたことが原因であると示唆された。

また、T β 10 と T β 4 の mRNA 発現局在は基質形成期において全く異なる様式を呈していた。Fig. 7 では、T β 10 が主に基質形成前の象牙芽細胞や前象牙芽細胞、前エナメル芽細胞に強く発現しているのに対し、T β 4 は前エナメル芽細胞にのみ発現が認められた。さらに、T β 10 の発現が認められる基質形成前の象牙芽細胞や前象牙芽細胞と T β 4 の発現が認められる前エナメル芽細胞は向かい合って位置していた。以上より、基質形成過程において、T β 10 発現を呈す前象牙芽細胞と T β 4 発現を呈す前エナメル芽細胞では、密に細胞間相互作用が働いていることが考えられた。また、これらの細胞では基質形成が開始されると T β 10 や T β 4 の発現が減弱するため、両因子が基質形成に関わる何らかの役割を担っている可能性が示唆された。この時期における T β 10 が有する新たな未知の機能を明確にするために、分子生物学的レベルでの更なる解明が必要である。

また、歯根形成期において T β 10 は HERS を形成する歯原性上皮細胞や HERS 周囲の歯乳頭組織、歯根膜組織の間葉系細胞に発現が認められた。これらの特徴的な発現様式より、T β 10 が歯根の外形を作り HERS を成長させる上で重要な役割を担っていることが示唆された。

本研究により、T β 10 と T β 4 が歯胚形成過程において、時期および部位特異的に全く異なる発現様式を示すことが明らかとなった。これまでの報告や本研究においても、T β 10 や T β 4 が歯胚形成過程において多機能を有していると報告している。しかしながら、T β 10 や T β 4 の上流もしくは下流にある歯胚形成に関与するシグナル伝達経路はまだ解明されていない。今後は、これらの遺伝子の機能的役割を解明し、歯胚形成に関わる様々な分子との関連を明らかにする必要がある。

6. 総 括

本研究では、歯胚形成に關与する新たな制御因子検索を目的として、マウス E15.5 において歯胚に高発現する T β 10 の解析を行った。T β 10 の歯胚形成過程における発現様式の特徴を明らかにするために、*in situ* Hybridization 法を用いて T β 10 と高相同性を有する T β 4 と比較検討した。また、歯胚形成における機能的役割を解明するために歯胚培養器官および歯原性細胞を用いた siRNA 法により機能解析を行い、以下のような結果を得た。

- 1) *in situ* Hybridization 法および Real-time PCR 法による検索の結果、T β 10 は胎生期において歯胚を含めた様々な臓器に高発現を示し、生後では発現量が減少した。これより、T β 10 が歯胚を含めた種々の器官の発生や発育に關与している事が示唆された (Fig. 20)。
- 2) T β 10 はマウス歯胚形成過程において、主に歯原性間葉由来の組織に高発現を示した。特に、帽状期では歯乳頭組織、鐘状期では歯髓組織に発現が認められた。また、基質形成期では前象牙芽細胞や前エナメル芽細胞に T β 10 mRNA が認められた。歯根形成期においては、HERS やその周囲の歯原性間葉細胞にも T β 10 の発現が確認できた (Fig. 21)。これより、T β 10 が歯胚の発生・発育の各段階において細胞増殖や細胞分化などの異なった機能を果たしている事が示唆された。
- 3) T β 10 機能阻害下での E11.0 下顎と E15.0 歯胚の器官培養の結果、T β 10 は蕾状期から鐘状期までの歯胚形態形成に關与し、特に歯原性細胞の増殖を制御することで歯胚形成に關与している事が示唆された。また、歯胚形成過程

において、T β 10 は歯原性細胞のアポトーシスには影響を与えなかった。

- 4) T β 10 機能阻害下での歯原性細胞培養の結果、T β 10 が上皮細胞と間葉系細胞の細胞増殖を制御することが示唆された。

以上より、T β 10 は歯胚形成過程において時期および部位特異的に発現し、歯胚の発生・発育に関与する必須の因子であることが示唆された。

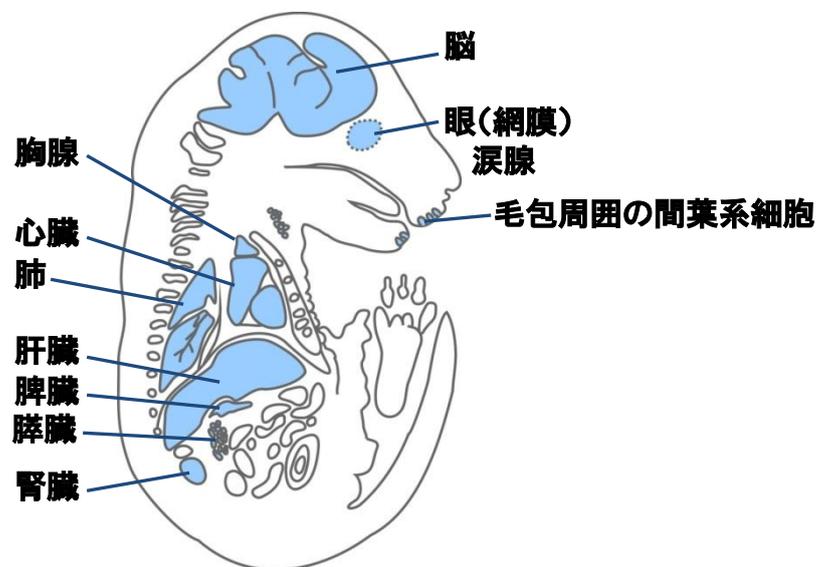


Fig. 20 胎生期にT β 10の高発現がみられた臓器

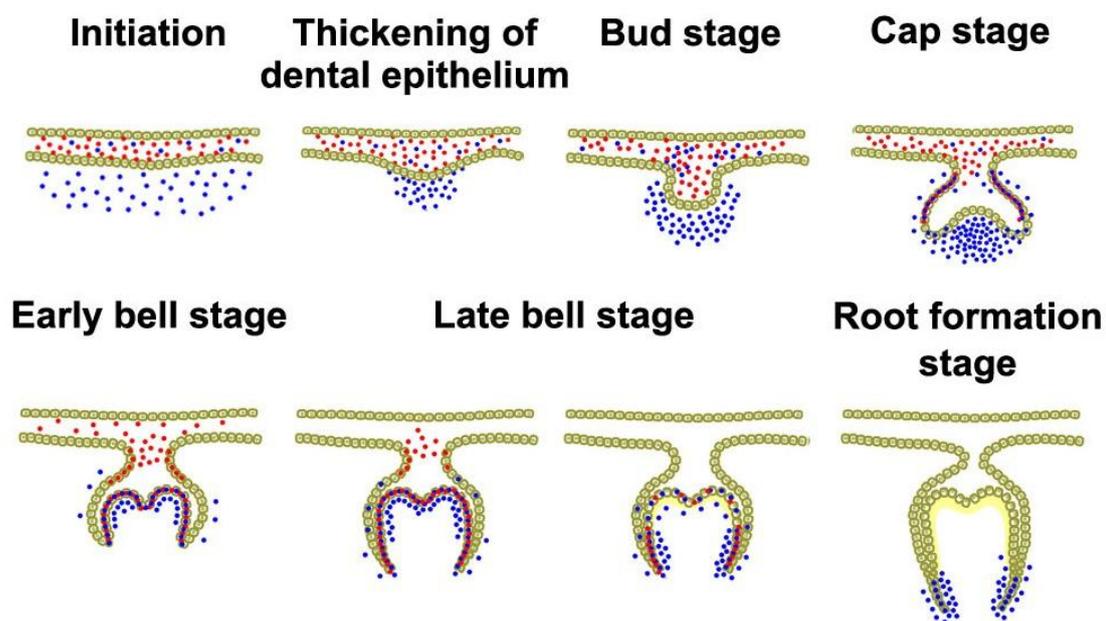


Fig. 21 マウス下顎第一臼歯歯胚の形成過程における Tβ10 と Tβ4 の mRNA 発現局在の模式図

赤: Tβ4 mRNA 発現局在、青: Tβ10 mRNA 発現局在。

7. 謝 辞

本研究は九州大学大学院 歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学研究分野 坂井英隆教授の御指導のもとに行われたものであり、先生の懇篤な御指導、御助言ならびに御高閲に深く感謝いたします。また、このような研究の機会を与えていただきました九州大学大学院 歯学研究院 口腔保健推進学講座 歯科矯正学分野 高橋一郎教授に深甚なる謝意を表します。本研究を遂行するにあたり、終始御指導を賜りました九州大学大学院 歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学研究分野 清島保准教授および和田裕子助教に深甚なる謝意を表します。さらに、実験手法の御指導および御助言を賜りました九州大学大学院 歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学研究分野 永田健吾助教に厚く感謝いたします。最後に、多くの御協力や御援助を頂きました、九州大学口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学研究分野ならびに口腔保健推進学講座 歯科矯正学分野の皆様にご心より御礼申し上げます。

8. 参考文献

- Akhter, M., Kobayashi, I., Kiyoshima, T., Matsuo, K., Yamaza, H., Wada, H., Honda, JY., Ming, X. and Sakai, H (2005) Possible functional involvement of thymosin beta 4 in developing tooth germ of mouse lower First molar. *Histochem Cell Biol* 124: 207–213
- Akhter, M., Kobayashi, I., Kiyoshima, T., Nagata, K., Wada, H., Ookuma, Y., Fujiwara, H., Honda, JY. and Sakai, H. (2010) In situ expression of 15 kDa interferon alpha responsive gene in the developing tooth germ of the mouse lower First molar. *J Mol Histol* 41: 185–191
- Carpintero, P., Franco, DAF., Anadón, R. and Gómez-márquez, J. (1996) Thymosin beta10 mRNA expression during early postimplantation mouse development. *FEBS Lett* 394: 103-106.
- Chen, J., Lan, Y., Baek, JA., Gao, Y. and Jiang, R. (2009) Wnt/beta-catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development. *Dev Biol* 334: 174–185
- Choi, SY., Kim, DK., Eun, B., Kim, K., Sun, W. and Kim, H. (2006) Anti-apoptotic function of thymosin-beta in developing chick spinal motoneurons. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 872-878
- Cobourne, MT. and Sharpe, PT. (2003) Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the First branchial arch. *Arch Oral Biol* 48: 1–14
- Daniela, F., Clara, G., Sonia, N., Annalisa, L., Viviana, M., Tiziana, C., Irene, M., Vassillios, F., Massimo, C. and Gavino, F. (2011) Thymosin beta 10 expression in developing human salivary glands. *Early Hum Dev* 87: 779–783
- Davies, AH., Roberts, AK., Shone, CC. and Acharya, KR. (2011) Super toxins from a super bug: structure and function of Clostridium difficile toxins. *Biochem J* 2011 Jun 15; 436(3): 517-526.

- Fanni, D., Gerosa, C., Nemolato, S., Locci, A., Marinelli, V., Cabras, T., Messina, I., Fanos, V., Castagnola, M. and Faa, G. (2011) Thymosin beta 10 expression in developing human salivary glands. *Early Hum Dev* 87: 779-783.
- Gerosa, C., Fanni, D., Nemolato, S., Locci, A., Marinelli, V., Cabras, T., Messina, I., Castagnola, M., Monga, G., Fanos, V. and Faa, G. (2010) Thymosin beta-10 expression in developing human kidney. *J Matern Fetal Neonatal Med Suppl* 3: 125-128.
- Gourlay, CW. and Ayscough, KR. (2006) Actin-induced hyperactivation of the Ras signaling pathway leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 26(17): 6487-6501.
- Hall, AK. (1995) Thymosin beta-10 accelerates apoptosis. *Cell Mol Biol Res* 41: 167-180
- Honda, JY., Kobayashi, I., Kiyoshima, T., Yamaza, H., Xie, M., Takahashi, K., Enoki, N., Nagata, K., Nakashima, A. and Sakai, H. (2008) Glycolytic enzyme P_{gk1} is strongly expressed in the developing tooth germ of the mouse lower first molar. *Histol Histopathol* 23: 423–432
- Honda, JY., Kobayashi, I., Kiyoshima, T., Nagata, K., Wada, H., Ookuma, Y., Fujiwara, H., Shiotsuka, M., Takahashi, I., Sakai, H., (2011) In situ expression of the mitochondrial ATPase6 gene in the developing tooth germ of the mouse lower first molar. *J Mol Hist* 42:83–90
- Ikeda, E., Morita, R., Nakao, K., Ishida, K., Nakamura, T., Takano-Yamamoto, T., Ogawa, M., Mizuno, M., Kasugai, S. and Tsuji, T. (2009) Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(32): 13475-13480
- Kim, YC., Kim, BG. and Lee, JH. (2012) Thymosin beta10 expression driven by the human TERT promoter induces ovarian cancer-specific apoptosis through ROS production. *PLoS One* 7: e35399

- Kobayashi, I., Kiyoshima, T., Wada, H., Matsuo, K., Nonaka, K., Honda, JY., Koyano, K. and Sakai, H. (2006) Type II/III Runx2/Cbfa1 is required for tooth germ development. *Bone* 38: 836–844
- Lee, SH., Son, MJ., Oh, SH., Rho, SB., Park, K., Kim, YJ., Park, MS. and Lee, JH. (2005) Thymosin β (10) inhibits angiogenesis and tumor growth by interfering with Ras function. *Cancer Res* 65: 137-148
- Lee, SH., Zhang, W., Choi, JJ., Cho, YS., Oh, SH., Kim, JW., Hu, L., Xu, J., Liu, J., and Lee, JH. (2001) Overexpression of the thymosin β -10 gene in human ovarian cancer cells disrupts F-actin stress fiber and leads to apoptosis. *Oncogene* 20: 6700-6706
- Lin, SC. and Morrison-Bogorad, M. (1990) Developmental expression of mRNAs encoding thymosins β 4 and β 10 in rat brain and other tissues. *J Mol Neurosci* 2: 35-44.
- Maltman, DJ., Brand, S., Belau, E., Paape, R., Suckau, D. and Przyborski, SA. (2011) Top-down label-free LC-MALDI analysis of the peptidome during neural progenitor cell differentiation reveals complexity in cytoskeletal protein dynamics and identifies progenitor cell markers. *Proteomics* 11: 3992-4006
- Mina, M. (2001) Regulation of mandibular growth and morphogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 12: 276-300
- Nakao, K., Morita, R., Saji, Y., Ishida, K., Tomita, Y., Ogawa, M., Saitoh, M., Tomooka, Y. and Tsuji, T. (2007) The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* 4(3): 227-230.
- Nemolato, S., Messana, I., Cabras, T., Manconi, B., Inzitari, R., Fanali, C., Vento, G., Tirone, C., Romagnoli, C., Riva, A., Fanni, D., Di, FE., Faa, G. and Castagnola, M. (2009) Thymosin β (4) and β (10) levels in pre-term newborn oral cavity and foetal salivary glands evidence a switch of secretion during foetal development. *PLoS One* 4: e5109.

- Ookuma, FY., Kiyoshima, T., Kobayashi, I., Nagata, K., Wada, H., Fujiwara, H., Yamaza, H., Nonaka, K. and Sakai, H. (2012) Multiple functional involvement of Thymosin beta-4 in tooth germ development. *Histochem Cell Biol*
- Oshima, M., Mizuno, M., Imamura, A., Ogawa, M., Yasukawa, M., Yamazaki, H., Morita, R., Ikeda, E., Nakao, K., Takano-Yamamoto, T., Kasugai, S., Saito, M. and Tsuji, T. (2011) Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS One* 6(7): e21531.
- Pispa, J., Mikkola, ML., Mustonen, T. and Thesleff, I. (2003) Ectodysplasin, Edar and TNFRSF19 are expressed in complementary and overlapping patterns during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 3: 675–679
- Santelli, G., Bartoli, PC., Giuliano, A., Porcellini, A., Mineo, A., Barone, MV., Busiello, I., Trapasso, F., Califano, D. and Fusco, A. (2002) Thymosin beta-10 protein synthesis suppression reduces the growth of human thyroid carcinoma cells in semisolid medium. *Thyroid* 12(9): 765-772
- Shigemura, N., Kiyoshima, T., Sakai, T., Matsuo, K., Momoi, T., Yamaza, H., Kobayashi, I., Wada, H., Akamine, A. and Sakai, H. (2001) Localization of activated caspase-3-positive and apoptotic cells in the developing tooth germ of the mouse lower first molar. *Histochem J* 33: 253-258.
- Sun, HQ., Kwiatkowska, K. and Yin, HL. (1996) Beta-Thymosins are not simple actin monomer buffering proteins. Insights from overexpression studies. *J Biol Chem* 271(16): 9223-9230
- Takahashi, KF., Kiyoshima, T., Kobayashi, I., Xie, M., Yamaza, H., Fujiwara, H., Ookuma, Y., Nagata, K., Wada, H., Sakai, T., Terada, Y. and Sakai, H. (2010) Protogenin, a new member of the immunoglobulin superfamily, is implicated in the development of the mouse lower first molar. *BMC Dev Biol* 10:115
- Thesleff, I. (2003) Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 116:1647–1648

- Thesleff, I. and Åberg, T. (1999) Molecular regulation of tooth development. *Bone* 25:123–125
- Thesleff, I., Vaahtokari, A., Kettunen, P. and Åberg, T. (1995) Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res* 32: 9–15
- Tsubakimoto, T., Kosaka, K., Saito, M. and Teranaka, T. (2007) immortalization of dental papilla cells differentiating into odontoblast in vitro. *Japanese J Conserv Dent* 50:10
- Tucker, AS., Al Khamis, A. and Sharpe, PT. (1998) Interactions between Bmp-4 and Msx-1 act to restrict gene expression to odontogenic mesenchyme. *Dev Dyn* 212(4): 533-539.
- Tucker, AS. and Sharpe, PT. (1999) Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. *J Dent Res* 78(4): 826-34
- Vainio, S., Karavanova, I., Jowett, A., and Thesleff, I. (1993) Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75: 45-58.
- van Kesteren, RE., Carter, C., Dissel, HMG., van Minnen, J., Gouwenberg, Y., Syed, NI., Spencer, GE. and Smit, AB. (2006) Local synthesis of actin-binding protein beta-thymosin regulates neurite outgrowth. *J Neurosci* 26(1): 152-157
- Wada, H., Kobayashi, I., Yamaza, H., Matsuo, K., Kiyoshima, T., Akhtar, M., Sakai, T., Koyano, K. and Sakai, H. (2002) In situ expression of heat shock proteins, Hsc73, Hsj2 and Hsp86 in the developing tooth germ of mouse lower first molar. *Histochem J* 34: 105–109
- Xie, M., Kobayashi, I., Kiyoshima, T., Yamaza, H., Honda, JY., Takahashi, K., Enoki, N., Akamine, A. and Sakai, H. (2007) Functional implication of nucleolin in the mouse Wrst molar development. *J Biol Chem* 282: 23275–23283

- Xie, M., Kobayashi, I., Kiyoshima, T., Nagata, K., Ookuma, Y., Fujiwara, H. and Sakai, H. (2009) In situ expression of ribosomal protein L21 in developing tooth germ of the mouse lower first molar. *J Mol Histol* 40: 361–367
- Xie, M., Jiao, T., Chen, Y., Xu, C., Li, J., Jiang, X. and Zhang, F. (2010) EMMPRIN (basigin/CD147) is involved in the morphogenesis of tooth germ in mouse molars. *Histochem Cell Biol* 133: 585-594.
- Yamaza, H., Matsuo, K., Kiyoshima, T., Shigemura, N., Kobayashi, I., Wada, H., Akamime, A. and Sakai, H. (2001a) Detection of differentially expressed genes in the early developmental stage of the mouse mandible. *Int J Dev Biol* 45: 675–680
- Yamaza, H., Matsuo, K., Kobayashi, I., Wada, H., Kiyoshima, T., Akhtar, M., Ishibashi, Y., Sakai, T., Akamine, A. and Sakai, H. (2001b) Expression of Set-alpha during morphogenesis of mouse lower first molar. *Histochem J* 33: 437–441
- Yoshizaki, K., Yamamoto, S., Yamada, A., Yuasa, K., Iwamoto, T., Fukumoto, E., Harada, H., Saito, M., Nakasima, A., Nonaka, K., Yamada, Y. and Fukumoto, S. (2008) Neurotrophic factor neurotrophin-4 regulates ameloblastin expression via full-length TrkB. *J Biol Chem* 283: 3385–3391
- Yu, FX., Lin, SC., Morrison-Bogorad, M., Atkinson, MA. and Yin, HL. (1993) Thymosin beta 10 and thymosin beta 4 are both actin monomer sequestering proteins. *J Biol Chem* 268: 502-509
- Zhang, T., Li, X., Yu, W., Yan, Z., Zou, H. and He, X. (2009) Overexpression of thymosin beta-10 inhibits VEGF mRNA expression, autocrine VEGF protein production, and tube formation in hypoxia-induced monkey choroid-retinal endothelial cells. *Ophthalmic Res* 41: 36-43