

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593053

研究課題名(和文) 歯種特異的な歯胚消失メカニズムの解明と臨床応用について

研究課題名(英文) Molecular genetic study of the specific tooth agenesis in the third molar of EL mice

研究代表者

朝田 芳信 (Asada, Yoshinobu)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：20184145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：EL/seaマウスにみられる歯種特異的な歯胚消失は、上皮と間葉の間に存在する基底膜分子であるインテグリン 3 1あるいは 6 1を介するラミニン 5への接着異常が原因と考えられた。その作用機序としては、インテグリン 1とラミニン 5の相互作用が働かないためアポトーシスの抑制に異常が生じ、結果として歯胚の発育に關する遺伝子群の細胞活性の低下を招き、歯胚の発育が停止し、最終的には消失する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A detailed study using Real time PCR, in situ hybridization, immunohistological analysis and DNA microarray revealed that the absence of third molars in EL/sea mice is strongly controlled by the interaction between beta 1 integrin and laminin alpha 5. These results suggest that Apoptosis and Hedgehog pathways are associated with the development of the tooth germs of M3 in the bud stage of EL mice. We concluded that the specific tooth agenesis in EL/sea mice is regulated by the basement membrane protein s such as beta 1 integrin and laminin alpha 5.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・強制・小児系歯学

キーワード：歯胚消失 ELマウス 第三臼歯 マイクロアレイ解析

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの歯の欠如に関しては、その出現頻度から大白歯群では上下顎第三大白歯が最も高く、続いて下顎第二小臼歯や側切歯にみられ、明らかな歯種特異的欠如が存在し、その発生要因は退化理論に沿うといわれている。近年、ノックアウトマウスを用いた研究から、*Pax9*、*Msx1*、*Pitx2*、*Gli2*、*Gli3* が歯胚の発育停止に関与すること、上顎の臼歯のみが欠損するマウス (*Dlx1*、*Dlx2* のノックアウト) あるいは下顎の臼歯と切歯が欠損するマウス (*Activin a* のノックアウト) が報告され、部位特異的な欠如には遺伝的要因の関与が示唆されている。しかし、ノックアウトマウスでは、遺伝子の機能を破壊することから、厳密な意味での歯種特異的な欠如歯モデルとはなり得ない。すなわち、歯種特異的欠如に関わる遺伝子相互作用を解明するためには、自然発症型のモデルマウスを用いることが、より効果的である。現在まで、歯の発生に関わる分子レベルの研究は、主にモデル動物が用いられてきたが、とくにマウスを用いた研究からは多くの知見が得られている (*Genes Dev*, 8:2691-2703, 1994, *Dev. Biol.*, 278:130-143, 2005, *Eur J Oral Sci.*, 116:1-10, 2008)。さらに、正常な歯胚の初期発生における上皮間葉系組織の遺伝子相互作用の解明が進められている (*Cell* 90:247-255, 1997, *Science* 282:1136-1138, 1998 *Human Molecular Genetics*, 3605-3617, 2005)。近年、第三臼歯を特異的に欠如する自然発症型マウス (EL/sea) を発見し、ヒトの歯の欠如のメカニズム解明の有用なモデルとなることが報告されている (*Ped Dent J*, 19-20, 2000)。そこで、EL マウスを用いることで、歯胚消失のメカニズムを解明し、将来的には歯胚のレスキューや第三大白歯の選択的消失という観点から医療の現場に役立てることが可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、自然発症型欠如歯モデルマウスである EL/sea を用い、上下顎第三臼歯に限局した歯胚の発育停止とその後に起こる歯胚の消失メカニズムを解明することを目的とする。すでに、一連の連鎖解析および分子生物学的研究から、EL/sea マウスにみられる歯の欠如には、*Lef1* ならびに *Shh* 遺伝子の関与が強く示唆されている。

そこで、本研究の目的は、EL/sea マウスを用い、第三臼歯にみられる歯胚の発育停止とその後の消失に対し、*Lef1* ならびに *Shh* 遺伝子がどのように関与するのかを遺伝子相互作用という観点から検討することである。さらに、歯胚の発育に関与する遺伝子群の細胞活性に注目し、上皮と間葉組織の間に存在する基底膜分子に注目し、上皮から間葉へのシグナル伝達における基底膜分子の役割についても検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学的観察

正常マウスである EL/Kw と第三臼歯歯胚消失モデルである EL/sea の 5 日、7 日、10 日齢について、*Pax9*、*Msx1*、*Gli1*、*Gli2*、ラミニン 5 ならびにインテグリン 1 の抗体で、免疫組織学的染色を行った。

歯胚の発育停止に関与することが報告されている *Pax9*、*Msx1*、*Gli1*、*Gli2* について、免疫染色を行い、過去に実施した *Shh* と *Lef1* 遺伝子の発現データと重ね合わせ、上皮間葉系の相互作用の関与について検討した。

EL/sea マウスにみられる歯胚の消失が、上皮から間葉側へのシグナル伝達異常が主原因である可能性が高く、そのため、基底膜に存在する分子として、ラミニン 5 を標的とした免疫染色を実施した。さらに、ラミニン 5 のレセプターであるインテグリン 1 についても検討した。

### (2) *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) による遺伝子発現量の経時的観察

*Lef1* および *Shh* 遺伝子を対象として遺伝子発現の局在を検討するため、生後 1 日、5 日、7 日、10 日齢の EL/sea および EL/kw から下顎骨を摘出し、組織の固定・包埋後、凍結切片を作製した。Vector への cDNA のサブクローニング後、テンプレート DNA の作製を行った。さらに、テンプレート DNA を用いて RNA プロブの作製ならびにテンプレート DNA の除去後、作製したプロブを用い標的遺伝子である *Lef1* および *Shh* のハイブリダイゼーションを非アイソトープ系抗体反応により実施し、シグナルを検出した。

### (3) DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析

EL/Kw および EL/sea の生後 5 日齢および 7 日齢における第一臼歯 (M1) と第二臼歯 (M2) を試料とし、Total RNA から cDNA を作製し、Cy3-labeled cRNA を用いて Hybridization し、スキャン後、画像解析を解析ソフト Agilent Feature Extraction を用いて行った。比較解析後、Pathway 解析を実施した。Pathway 解析は KEGG のデータベースを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫組織化学的観察

歯胚消失に関わる遺伝子群の発現について

EL/Kw の 5 日齢、7 日齢および EL/sea マウスの 5 日齢、7 日齢、10 日齢において *Msx1*、*Gli1*、*Gli2* 遺伝子発現が認められなかった。しかし、EL/Kw マウスの 10 日齢において、象牙質の一部で *Msx1* 遺伝子 (図 1) および *Gli2* 遺伝子 (図 2) の発現が認められた。

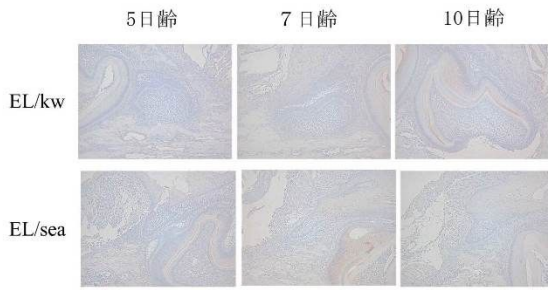


図1 Msx1遺伝子の発現 ×100

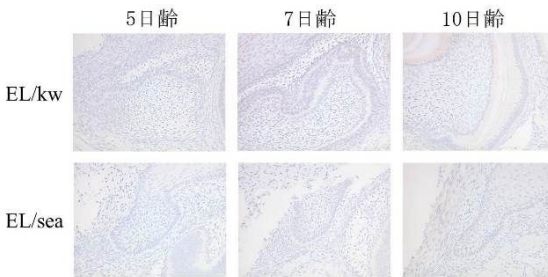


図2 Gli2遺伝子の発現 ×200

一方、Pax9遺伝子については、EL/Kw マウスの5日齢および7日齢では歯乳頭と歯胚外側のとくに遠心側ならびに象牙芽細胞に発現が認められ、10日齢ではわずかに歯乳頭と象牙芽細胞に発現が認められた。しかし、EL/sea マウスではすべての日齢において歯胚の周囲に発現がみられた(図3)。

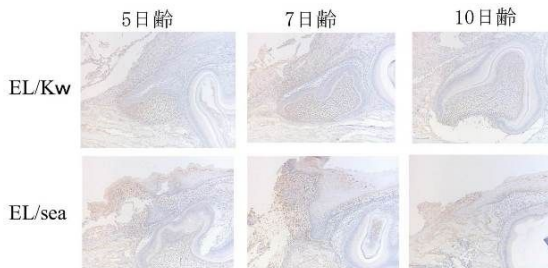


図3 Pax9遺伝子の発現 ×100

基底膜に存在する分子であるラミニン 5 およびインテグリン 1 の発現について  
 a: ラミニン 5: EL/Kw マウスにおいては、5日齢で内エナメル上皮に発現し、7日齢では内エナメル上皮、歯乳頭のエナメル結節付近に発現が認められ、10日齢ではエナメル芽細胞および象牙質で発現が認められ、歯乳頭のエナメル結節付近でもわずかに発現が認められた。一方、EL/sea マウスでは、全ての日  
 b: インテグリン 1: EL/kw マウスにおいては5日齢で内外エナメル質および歯小嚢に発現が認められた。7日齢では内エナメル上皮と歯小嚢での発現が強く、10日齢では象牙質および歯小嚢で発現が認められた。一方、EL/sea マウスにおいては全ての日齢で歯胚の基底細胞と歯小嚢に発現が認められた。

(2) ISHによる遺伝子発現量の経時的観察  
 EL/Kw マウスにおいては、Lef1 および Shh 遺伝子の発現は5日齢、7日齢、10日齢のすべての日齢で認められた。一方、EL/sea マウスでは、Lef1 遺伝子の ISHにおいて、5日齢で

は発現が認められたが、7日齢と10日齢では発現が認められなかった。一方、Shh 遺伝子では5日齢、7日齢、10日齢において発現は認められなかった。

(3) DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析結果

5日齢における解析結果

a: Apoptosis pathway

P13K、TNF ならびに NF の発現が EL/Kw に比べ、EL/sea マウスで大きく低下していた。一方で、Bad の発現は EL/Kw に比べ、EL/sea マウスで上昇していた。

b: Hedgehog pathway

Shh には変化なく、Ptc、Smo ならびに Wnt の発現が EL/Kw に比べ、EL/sea マウスで大きく低下していた。

7日齢における解析結果

a: Jak - STAT pathway

P13K および JAK の発現が EL/Kw に比べ、EL/sea マウスで大きく低下していた。

過去の報告から上皮側の Shh は EL/Kw マウスでは正常な過程をたどるのに対して、EL/sea マウスでは5日齢で歯胚の内外エナメル上皮にわずかな発現がみられる程度であった。さらに、Lef1 遺伝子では5日齢において、上皮側からのシグナルが上手に伝わらないため、間葉側での発現が弱くなり、その後、上皮間葉系の相互作用が働かないため、形態異常が進むことが考えられた。本研究において、Pax9 遺伝子は間葉側での発現が中心になるが、本研究において、EL/Kw マウスに比べ、EL/sea マウスでは5日齢から発現が弱く部位特異的ではなかった。上記の結果を考え合わせると、すでに、5日齢から発育異常が認められ、それは上皮側から間葉側へのシグナル伝達に異常があるため、そのキープポイントは上皮と間葉の間に存在する基底膜であり、その基底膜で重要な役割を演じているのが、インテグリン 1 とラミニン 5 である。とくに、上皮のインテグリン 1 とラミニン 5 は、内エナメル上皮の極性化に重要であることが知られている。

本研究においてラミニン 5 の免疫染色結果では、EL/Kw マウスでは正常に発現するのに対して、EL/sea マウスの5日齢において、本来内エナメル上皮に発現が局限するはずのものが、歯胚全体に異常発現していた。さらに、7日齢および10日齢では、発現は消失していた。さらに、インテグリン 1 における免疫染色でも発現異常が見られた。そこで、EL/sea マウスにみられる歯種特異的な歯胚の消失がラミニン 5 とインテグリン 1 の相互作用の異常によって、どのような影響を受けるのかを検討するため、EL/Kw および EL/sea マウスの M1 および M2 の臼歯を試料に、マイクロアレイ解析を実施した。その結果として Apoptosis pathway、Hedgehog pathway の関与が示唆された。

以上の結果から、EL マウスにみられる M3

の歯胚消失には、基底膜分子であるインテグリン 1 とラミニン 5 が強く関与し、同時にアポトーシスシグナルに影響を与え、歯胚の発育に関与する遺伝子群（とくに、Lef1、Shh ならびに Pax9 遺伝子）の細胞活性を低下させている可能性が示唆された。

#### 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）

〔学会発表〕(計 1 件)

成山 明具美、伊平 弥生、宗正 隆明、朝田 芳信、歯種特異的な歯胚消失メカニズムの解明に向けて、第 51 回日本小児歯科学会学術大会、2013 年 5 月 23-24 日、岐阜県。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

朝田 芳信 (ASADA YOSHINOBU)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：20184145

##### (2) 研究分担者

伊平 弥生 (IDAIRA YAYOI)  
鶴見大学・歯学部・講師  
研究者番号：40200018