

令和元年5月21日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11002

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析を用いた破骨細胞分化抑制マウスにおける歯の萌出機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of tooth eruption in DAP12 deficient and DAP12/FcRr deficient mice with impaired osteoclast differentiation using comprehensive gene expression analysis

研究代表者

中村 恵 (Nakamura, Megumi)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20431512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞分化が抑制された遺伝子欠損マウスのうち、歯が萌出するDAP12欠損マウスとDAP12/FcRr欠損マウス、歯が萌出しないc-fos欠損マウスを用いて、萌出過程にある歯・歯周組織を形態学的に検討した。μCT解析と組織学的解析から、生後12週の下顎では野生型マウスと比較してDAP12/FcRr欠損マウスの骨量は高いが、生後2週ではDAP12欠損マウスの骨量は野生型マウスと同程度であり、TRAP陽性細胞が存在することがわかった。この結果から、生後1ヶ月まではDAP12欠損マウスおよびDAP12/FcRr二重欠損マウスの下顎骨に破骨細胞が存在し、大理石骨病様を呈さない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

破骨細胞分化が抑制されたDAP12欠損マウスとDAP12/FcRr二重欠損マウスの顎骨・歯・歯周組織についての詳細な情報はなく、本研究が初めての報告となる。また、網羅的遺伝子解析によりDAP12とFcRrの欠損に対して代償性に働く分子が同定できる可能性がある。

従って、本研究により得られる結果は、破骨細胞分化に關与する新規の分子を特定し、破骨細胞分化の分子メカニズムの解明に貢献するとともに、複雑な歯の萌出メカニズムの一端を解明し、顎口腔領域の発生研究分野に有益な情報を提供できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the teeth and surrounding periodontal tissues in the process of eruption were morphologically examined in DAP12 deficient and DAP12/FcRr double deficient mice with normal tooth eruption in spite of inhibited osteoclast differentiation and c-fos deficient mice with failure of tooth eruption due to impaired osteoclast differentiation. Micro-CT and histological analyses showed that TRAP-positive cells were detected in the mandible of 2-week-old DAP12 deficient mice and mandibular bone volume in DAP12 deficient mice were similar to that in wild type mice at two weeks of age, while mandibular bone volume in 12-week-old DAP12/FcRr deficient mice were higher than wild type mice.

These data suggest that osteoclasts are present in the mandibular bone of DAP12 deficient and DAP12/FcRr deficient mice, and these mice may not exhibit osteopetrosis until they are one month old.

研究分野：硬組織形成

キーワード：DAP12 FcRr 破骨細胞分化 歯の萌出 大理石骨病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯の萌出過程では、歯胚周囲にある骨を破骨細胞が吸収して歯の萌出路を形成する。近年、遺伝子欠損マウスの解析により、破骨細胞分化に関わる分子の同定が進んでいる。例えば、骨芽細胞により産生されるサイトカインである macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) と receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) や、破骨細胞前駆細胞に発現する RANKL 受容体である RANK、転写因子 activating protein-1 (AP-1) の構成要素である c-Fos 等の分子は、破骨細胞分化に必須であり、これらの分子の遺伝子欠損マウスは、成熟した破骨細胞が形成されないため、骨量・骨密度が増加して大理石骨病を呈する。さらに、歯の萌出路形成が障害されるため、歯の萌出が起こらない。

2003年に、DAP12欠損マウスが中程度の大理石骨病を呈するとの報告があり (Kaifu T, Takai T et al. *J Clin Invest* 111(3):323-32, 2003)、さらに翌年、DAP12とFcR $\gamma$ の二重欠損マウスが重篤な大理石骨病を発症するとの報告があった (Koga T, Takai T et al. *Nature* 428(6984):758-63, 2004)。これらの研究から、DAP12とFcR $\gamma$ が破骨細胞分化に必須の分子であることが明らかにされた。しかしながら、症状が重度であるDAP12とFcR $\gamma$ の二重欠損マウスにおいて、破骨細胞分化が障害されているにもかかわらず、歯の萌出は起こるとされている。現在まで、DAP12とFcR $\gamma$ の二重欠損マウスにおける歯および歯周組織についての報告はなく、なぜ破骨細胞形成が障害されても歯の萌出が起こるのかは不明である。

## 2. 研究の目的

「DAP12とFcR $\gamma$ の欠損に対して代償性に働く分子が歯小囊に発現し、歯の萌出を促す」との仮説をもとに、破骨細胞分化が抑制された遺伝子欠損マウスのうち、歯の萌出が起こるDAP12欠損マウスおよびDAP12/FcR $\gamma$ 二重欠損マウスと、歯の萌出が起こらないc-fos欠損マウスを用いて、萌出過程にある歯・歯周組織(歯小囊や周囲骨)を形態学的および分子生物学的に比較検討し、DAP12とFcR $\gamma$ の欠損に対して代償性に働く分子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

実験動物の取り扱いについては、東北大学における動物実験に関する指針に則った。実験には、DAP12欠損マウスとDAP12/FcR $\gamma$ 二重欠損マウス、c-fos欠損マウス、野生型(C57BL/6)マウスを用いた。

### (2) マイクロCT解析

生後2週・3週のc-fos欠損マウスと、生後1週・2週・3週・4週・12週の他の3系統のマウスをイソフランの過剰吸入により安楽死させて下顎を摘出し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)/0.1Mリン酸緩衝液(PBS)で固定後、マイクロCT撮影を行った。

### (3) 組織学的解析

マイクロCT撮影後の試料を脱灰し、パラフィン包埋あるいは凍結包埋した。5 $\mu$ m厚の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色あるいは酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色を施し、各マウスの歯・歯周組織について組織学的に比較検討を行った。

### (4) Real-time PCR法による解析

生後3週と12週のDAP12欠損マウスとDAP12/FcR $\gamma$ 二重欠損マウス、野生型マウスをイソフランの過剰吸入により安楽死させて下顎を摘出し、臼歯より後方部の骨を採取して超音波ホモゲナイザーを用いて破砕後、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN)を用いてトータルRNAを抽出した。抽出したトータルRNAからrandom primer (Invitrogen)と逆転写酵素のSuperScript (Invitrogen)を用いてcDNAを合成した。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロCT解析

生後3週齢になると、DAP12欠損マウスとDAP12/FcR $\gamma$ 二重欠損マウスは野生型マウス同様、歯の萌出がみられたが、c-fos欠損マウスでは歯の萌出は認められなかった。また、生後12週齢では、野生型マウスと比較してDAP12/FcR $\gamma$ 二重欠損マウスの骨量は増加しており、大理石骨病様を呈していた。この結果は、従来の報告と一致するものである。さらに、生後4週齢と12週齢のDAP12/FcR $\gamma$ 二重欠損マウスの下顎を比較検討したところ、生後4週齢よりも生後12週齢で骨量が増加していた。

### (2) 組織学的解析

生後2週齢のDAP12欠損マウスとc-fos欠損マウス、野生型マウスの下顎臼歯部の組織切片

を作製し、比較検討を行った。その結果、c-fos 欠損マウスはすでに骨量の増加が認められ、大理石骨病様を示していたが、DAP12 欠損マウスでは正常な歯根膜形成がみられ、骨の構造も野生型マウスと同様であった ( 図 1 )。

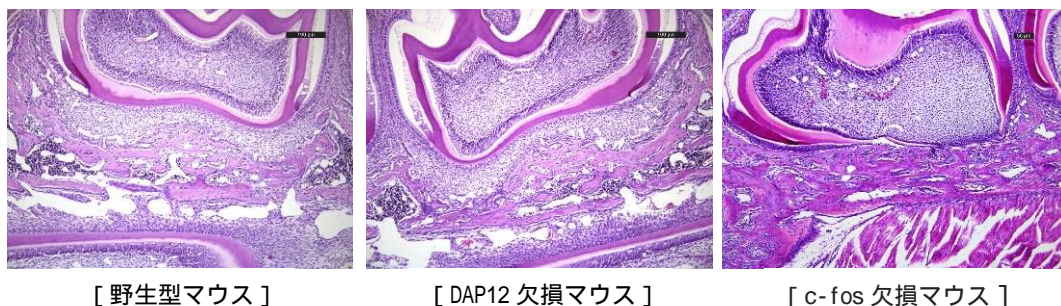


図 1 : 下顎第一臼歯部の H-E 染色像

さらに、各マウスの隣接切片に TRAP 染色を施し、比較検討を行った。c-fos 欠損マウスの下顎骨には、TRAP 陽性細胞は検出されなかったが、DAP12 欠損マウスの下顎骨には、野生型マウスと同様に、骨表面に TRAP 陽性細胞がみられた ( 図 2 )。

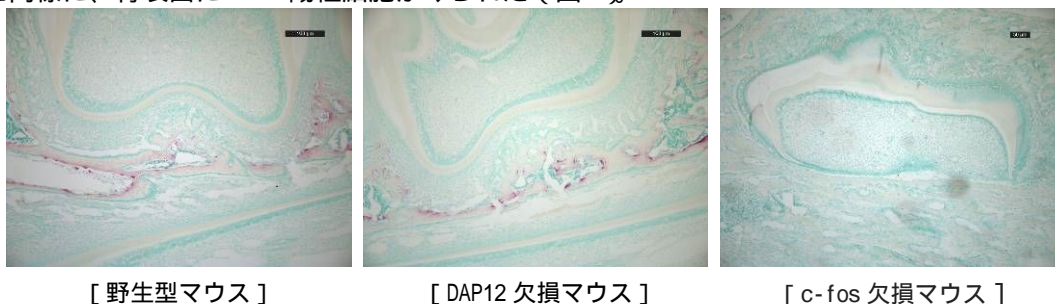


図 2 : 下顎第一臼歯部の TRAP 染色像

### (3) まとめ

以上のことから、DAP12 欠損マウスと DAP12/FcR 二重欠損マウスは、生後 1 ヶ月までは破骨細胞の出現や骨に異常は見られないが、生後 12 週になると骨量が増加して大理石骨病様になる可能性が示唆された。また Real-time PCR については、サンプル採取後に mRNA の定量解析を行うに至らず、破骨細胞のマーカー分子について調べることができなかった。今後、生後 12 週齢の DAP12 欠損マウスと DAP12/FcR 二重欠損マウスの下顎における、さらなる検討が必要であると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

Otake Y, Nakamura M, Henmi A, Takahashi T, Sasano Y. Experimental comparison of the performance of cutting bone and soft tissue between piezosurgery and conventional rotary instruments. *Sci Rep.* 2018;8(1):17154. doi:10.1038/s41598-018-35295-6. ( 査読有 )

Henmi A, Okata H, Mikami Y, Sasano Y. Calcification in rat developing mandibular bone demonstrated by whole mount staining, micro-computed tomography and scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy. *Biomed Res.* 2017;38(5):277-284. doi:10.2220/biomedres.38.277. ( 査読有 )

Maruyama K, Henmi A, Okata H, Sasano Y. Analysis of calcium, phosphorus, and carbon concentrations during developmental calcification of dentin and enamel in rat incisors using scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX). *J Oral Biosci.* 2016;58:173-179. ( 査読有 )

Henmi A, Okata H, Anada T, Yoshinari M, Mikami Y, Suzuki O, Sasano Y. Bone matrix calcification during embryonic and postembryonic rat calvarial development assessed by SEM-EDX, XRD and FTIR. *J Bone Miner Metab.* 2016;34(1):41-50. doi:10.1007/s00774-014-0647-x. ( 査読有 )

### 〔学会発表〕(計 15 件)

中村恵, 笹野泰之. 凍結歯胚移植に伴う硬組織形成の形態学的解析. 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「硬組織の細胞分化と再生におけるニューパラダイム: 形

態学的アプローチ」. 2019年3月27~29日, 新潟.

笹野泰之, 逸見晶子, 大方広志, 中村恵, 鈴木治. 発生・修復に伴う硬組織石灰化の元素イメージング. 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会 ワークショップ「組織化学イメージングで探る硬組織の細胞機能」. 2018年9月29・30日, 宮崎.

笹野泰之. 硬組織の発生と修復におけるバイオミネラリゼーションのイメージング解析. 大学院歯学研究セミナー・第420/421回北海道歯学会例会. 2018年8月6日, 札幌.

Liao Caiyu, Atsuko Kayaba, Miyuki Mayanagi, Megumi Nakamura, Yasuyuki Sasano. Three-dimensional visualization of embryonic bone development with serial-semithin-section SEM. 日本学術振興会 二国間交流事業 共同研究・セミナー「ミニモデリングにおける骨細胞ネットワークの新規調節機構」. 2018年8月5日, 札幌.

Yasuyuki Sasano. Biomineralization imaging of bone development and healing by analytical electron microscopy. The 26th International Symposium on Morphological Sciences (ISMS2018). July 5-7, 2018. Prague, Czech Republic.

中村恵, 笹野泰之. 歯胚移植における凍結保存の実験的応用. 第62回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2017年10月20~22日, 京都.

大竹義雄, 中村恵, 逸見晶子, 笹野泰之, 高橋哲. 骨と軟組織の切削におけるピエゾサージェリーと回転切削器具の実験的比較検討. 第62回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2017年10月20~22日, 京都.

中村恵, 笹野泰之. 凍結保存歯胚を移植すると、歯根が伸長し歯が萌出する. 第59回歯科基礎医学会学術大会. 2017年9月16~18日, 松本.

大竹義雄, 中村恵, 逸見晶子, 高橋哲, 笹野泰之. 骨と軟組織に対するピエゾサージェリーの切削能に関する実験的検討. 第59回歯科基礎医学会学術大会. 2017年9月16~18日, 松本.

青山直樹, 中村恵, 笹野泰之. マウス下顎骨発生過程では破骨細胞は石灰化に先行して出現する. 第59回歯科基礎医学会学術大会. 2017年9月16~18日, 松本.

Yasuyuki Sasano. Calcification process of bone growth by analytical electron microscopy. The 25th International Symposium on Morphological Sciences (ISMS2017). July 26-30, 2017. Xi'an, China.

Li Xinghan, Megumi Nakamura, Yasuyuki Sasano. Transplantation of cryopreserved mouse tooth germ. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017年3月28~30日, 長崎.

笹野泰之. 硬組織の発生成長と修復に伴う石灰化の成熟. 第343回松本歯科大学院セミナー. 2016年11月11日, 松本.

笹野泰之. 硬組織に対する脱灰と免疫染色の基本. 第41回組織細胞化学会・講習会. 2016年8月3~5日, 仙台.

笹野泰之, 逸見晶子, 大方広志, 中村恵, 鈴木治. 発生・修復に伴う硬組織石灰化の元素イメージング. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「石灰化研究の新展開」. 2016年3月28~30日, 郡山.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 笹野 泰之

ローマ字氏名:( SASANO, yasuyuki )  
所属研究機関名:東北大学  
部局名:歯学研究科  
職名:教授  
研究者番号(8桁):30196191

(2) 連携研究者

連携研究者氏名:高井 俊行  
ローマ字氏名:( TAKAI, toshiyuki )

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。