

平成21年 5月20日現在

研究種目： 若手研究（B）

研究期間： 2007～2008

課題番号： 19791560

研究課題名（和文） 口腔領域の発生、分化における転写活性制御機構の組織学的解析

研究課題名（英文） The expression of calcineurin subunits in the developing tooth

研究代表者

大島 昇平（OSHIMA SHOHEI）

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号： 00374546

研究成果の概要： カルシニューリンは、カルシウムを介する情報伝達機構に関わる分子であり、セリン/スレオニンフォスファターゼの一つである。本研究では歯の形成期におけるカルシニューリンの発現を調べた。カルシニューリンは歯胚領域において細胞分化期、硬組織形成期に発現しており、歯胚の発育段階によって異なる役割を果たしている可能性が考えられる。またサブユニット間で細胞内局在は異なっており、サブユニットごとに異なる役割を果たしている事も考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	3,690,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 矯正・小児系歯学

キーワード： カルシニューリン 歯胚 マウス 発育 硬組織

## 1. 研究開始当初の背景

歯の発生の仕組みを解明することは歯科学の重要な課題の一つである。国内外においても、分子レベルでの研究が進められ、種々の遺伝子、成長因子、転写因子等が歯の発生過程に発現することが報告されているが、まだ明らかではない部分が多い。本研究は、歯胚の発生、分化に必要なシグナル分子としてカルシニューリンに着目した。カルシニューリンは、カルシウムを介する情報伝達機構に

関わる分子であり、セリン/スレオニンフォスファターゼの一つである。カルシニューリンは触媒サブユニットと調節サブユニットからなる二量体を形成し、触媒サブユニットとしてはCNA $\alpha$ 、CNA $\beta$ 、CNA $\gamma$ が存在し、調節サブユニットとしてはCNB1、CNB2が知られている。近年、様々なシグナル伝達の制御にカルシニューリンが関与していることが明らかになっている。発生に関して挙げれば、カルシニューリンによって転写活性が制御

される転写調節因子 NF-AT が、生物の初期発生における体軸形成に大きな役割を果たしていることが解明された。歯胚発生初期に間葉から分泌される成長因子の一つに BMP-2 が存在するが、軟骨発生における BMP-2 の発現調節にカルシニューリンが関与していることが報告された。さらに、歯胚の萌出期に歯小嚢に EGF レセプターが発現するが、ショウジョウバエにおいては EGF レセプターを介するシグナル伝達経路の制御にカルシニューリンが関与していると報告された。また、心筋や骨格筋の発達にもカルシニューリンが関わる事も報告されている。骨芽細胞の分化にカルシニューリンが関わる事が報告されており、さらに破骨細胞の分化に関わることも明らかにされている。以上より、カルシニューリンが歯胚の発育に関わっている可能性は十分に考えられる。

## 2. 研究の目的

歯の発生の過程にカルシニューリンがどの段階のどの細胞に発現しているか組織学的に解析して、歯の発生におけるカルシニューリンの役割を検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) アイソトープ、凍結未脱灰切片を用いた in situ hybridization 法による歯胚領域におけるカルシニューリンサブユニット mRNA の発現解析

胎生 15 日 (E15) から生後 7 日 (P7) のマウスをもちいて歯胚領域を含む急速凍結切片を作成する。作成した切片について、カルシニューリンの各サブユニット CNA $\alpha$ 、CNA $\beta$ 、CNA $\gamma$ 、CNB1、CNB2 に対する <sup>33</sup>P で標識されたオリゴプローブを用いて、in situ hybridization 法を行う。オリゴプローブについては本学医学研究科解剖発生学渡辺雅彦教授より供与を受けた。

- (2) cRNA プローブを用いた in situ hybridization 法による歯胚領域における CNA $\gamma$  mRNA の発現解析

本研究では (株) ジェノスタッフ (東京) に解析を依頼した。

- (3) アイソトープ、脱灰パラフィン切片を用いた in situ hybridization 法による歯胚領域におけるカルシニューリンサブユニット mRNA の発現解析

E15 から P7 までのマウスの歯胚領域を含む顎骨部を EDTA にて脱灰し、パラフィン切片を作成する。作成した切片について、CNA $\alpha$ 、

CNA $\beta$ 、CNA $\gamma$ 、CNB1、CNB2 に対する <sup>33</sup>P で標識されたオリゴプローブを用いて、in situ hybridization 法を行う。

- (4) 免疫組織化学法を用いた歯胚領域におけるカルシニューリンサブユニットの発現解析

E15 から P7 までのマウスの歯胚領域を含む顎骨部を EDTA にて脱灰し、パラフィン切片を作成する。作成した切片について、抗 CNA $\alpha$  抗体、抗 CNA $\beta$  抗体、抗 CNB1 抗体を用いて免疫組織化学法を行う。抗体については本学医学研究科解剖発生学渡辺雅彦教授より供与を受けた。

## 4. 研究成果

- (1) 歯胚領域におけるカルシニューリンサブユニット mRNA の発現

最初にアイソトープ、凍結未脱灰切片を用いた in situ hybridization 法による解析を行った。

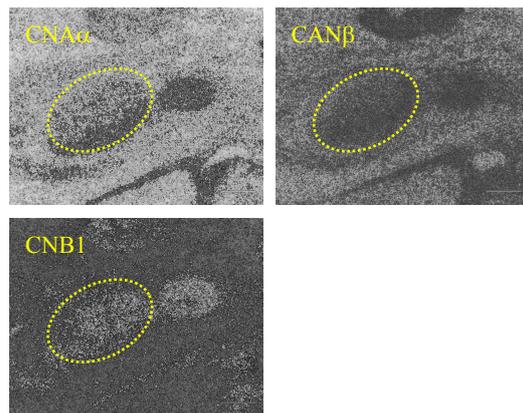


図 1 帽状期 E15 マウス臼歯歯胚領域におけるカルシニューリンサブユニット mRNA の発現。点線内が臼歯歯胚領域。スケールバーは 200 $\mu$ m。

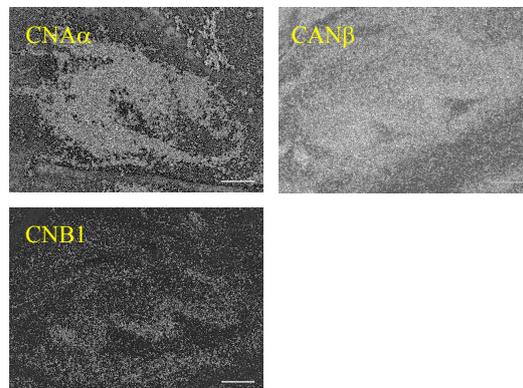


図 2 鐘状期 E18 マウス臼歯歯胚領域におけるカルシニューリンサブユニット mRNA の発現。スケールバーは 200 $\mu$ m。

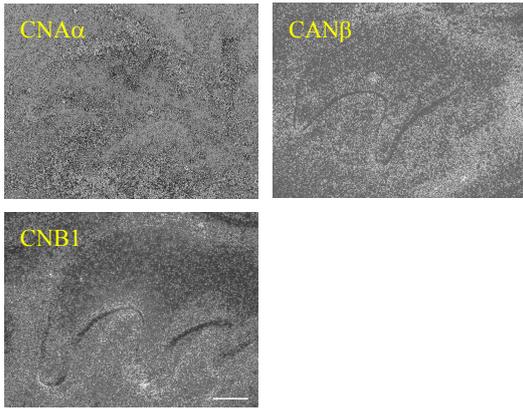


図3 硬組織形成期 P3 マウス臼歯歯胚領域におけるカルシニューリンサブユニット mRNA の発現。  
スケールバーは 200 $\mu$ m。

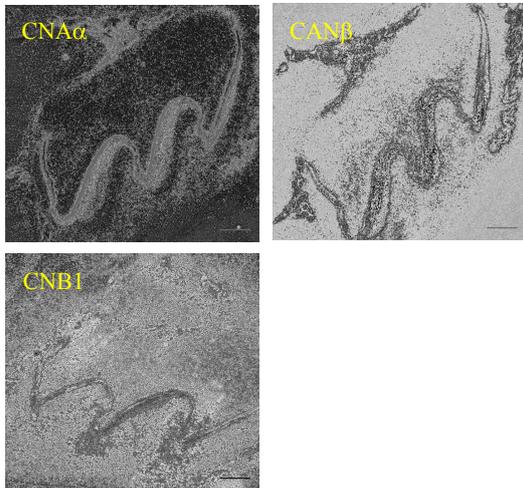


図4 硬組織形成期 P7 マウス臼歯歯胚領域におけるカルシニューリンサブユニット mRNA の発現。  
スケールバーは 200 $\mu$ m。

図1から図4までに示すように CNA $\alpha$  mRNA、CNA $\beta$  mRNA、CNB1 mRNA は帽状期から硬組織形成期にかけての臼歯歯胚に発現がみられた。CNB2 mRNA は発現が認められなかった。CNA $\gamma$  mRNA については発現がみられたが、特異的な発現であるかはっきりしなかった。そこで、cRNA プロブを用いた in situ hybridization 法とアイソトープと脱灰パラフィン切片を用いた in situ hybridization 法を用いて CNA $\gamma$  mRNA の発現を解析したが、特異的な発現であるとの確証は得られなかった。以上より歯胚には CNA $\alpha$  mRNA、CNA $\beta$  mRNA、CNB1 mRNA が発現していると考えられる。

(2) 免疫組織化学法をもちいた歯胚領域における CNA $\alpha$ 、CNA $\beta$ 、CNB1 サブユニットの発現

in situ hybridization 法で発現が確認された CNA $\alpha$ 、CNA $\beta$ 、CNB1 について免疫組織化学法を用いて発現を検討した。

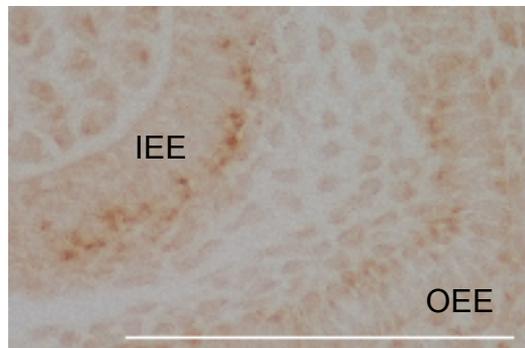
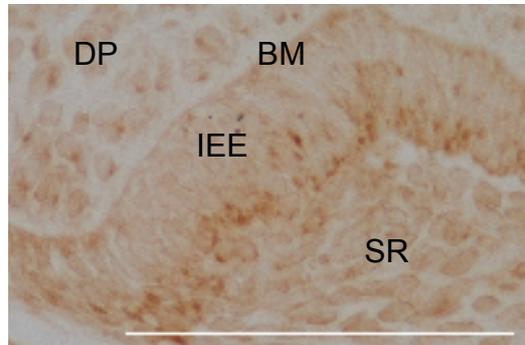
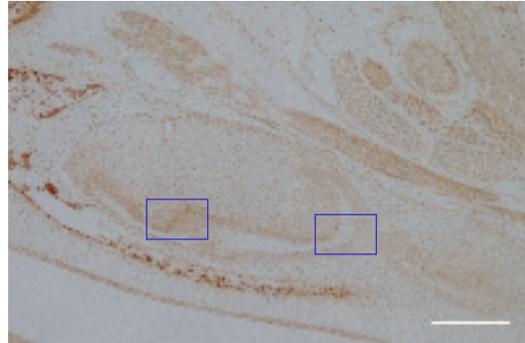


図5 帽状期 E15 マウス臼歯領域における CNA $\alpha$ サブユニットの発現。上段の青枠内を拡大して中段、下段に示す。

上段のスケールバーは 200 $\mu$ m。

中段、下段のスケールバーは 100 $\mu$ m。

DP: 歯乳頭 BM: 基底膜

IEE: 内エナメル上皮 SR: 星状網

OEE: 外エナメル上皮

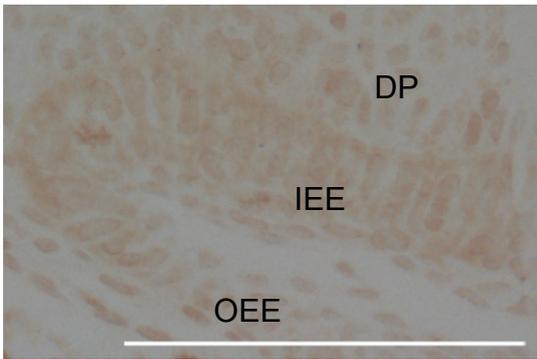
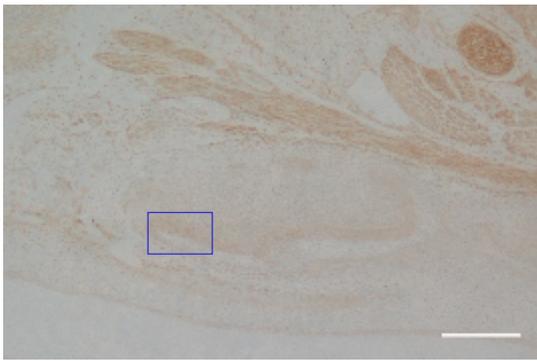


図6 帽状期 E15 マウス臼歯領域における CNA $\beta$ サブユニットの発現。上段の青枠内を拡大して下段に示す。  
上段のスケールバーは 200 $\mu$ m。  
下段のスケールバーは 100 $\mu$ m。  
DP: 歯乳頭 IEE: 内エナメル上皮  
OEE: 外エナメル上皮

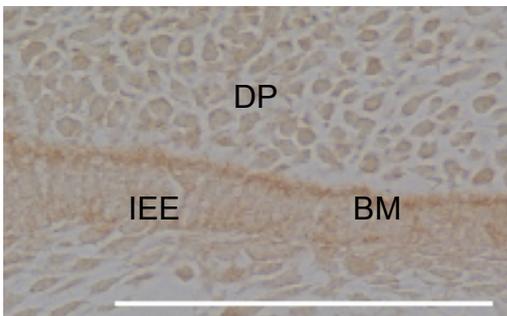
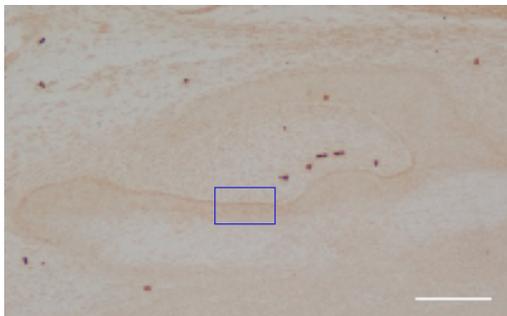


図7 帽状期 E15 マウス臼歯領域における CNAB1 サブユニットの発現。上段の青枠内を拡大して下段に示す。  
上段のスケールバーは 200 $\mu$ m。  
下段のスケールバーは 100 $\mu$ m。  
DP: 歯乳頭 IEE: 内エナメル上皮  
BM: 基底膜

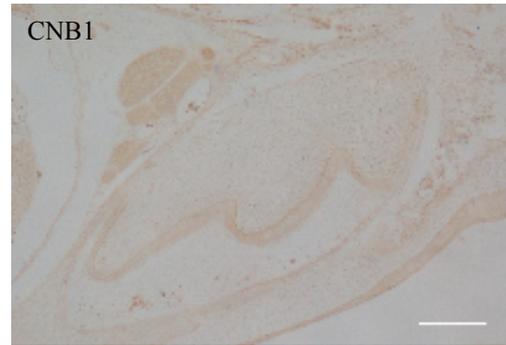
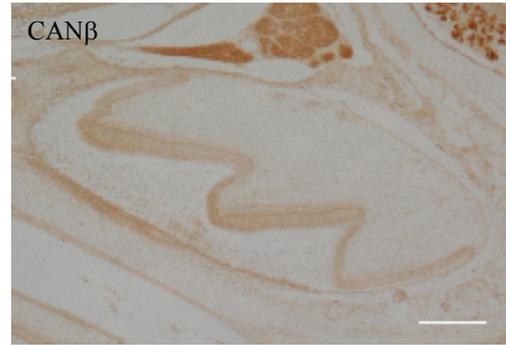
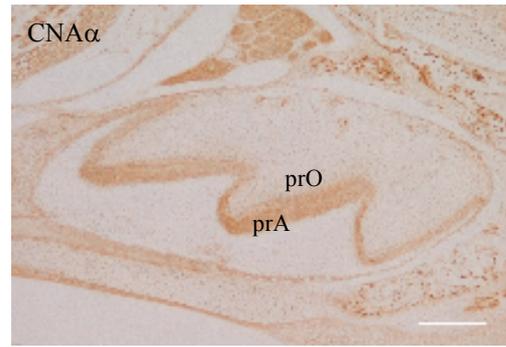


図8 鐘状期 E18 マウス臼歯領域におけるカルシニューリンサブユニットの発現。  
スケールバーは 200 $\mu$ m。  
prA: 前エナメル芽細胞  
prO: 前象牙芽細胞

図5から図8に示すように帽状期から鐘状期にかけての細胞分化期の歯胚には CNA $\alpha$ 、CNA $\beta$ 、CNB1 が歯胚上皮由来の細胞と外胚葉性間葉由来の細胞両方に発現していた。触媒サブユニットである CNA $\alpha$ 、CNA $\beta$  の発現についてみると、発現している細胞はほぼ同じであったが、細胞内での局在が異なっていた。

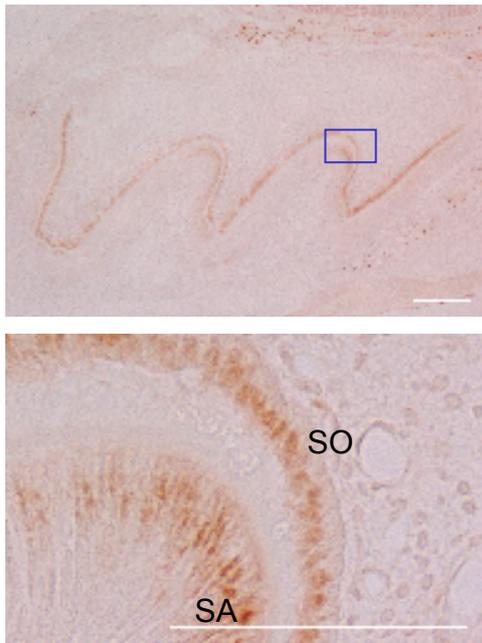


図9 硬組織形成期 P3 マウス臼歯歯胚領域における CNA $\alpha$ サブユニットの発現。上段の青枠内を拡大して下段に示す。上段のスケールバーは 200 $\mu$ m。下段のスケールバーは 100 $\mu$ m。SA：エナメル芽細胞 SO：象牙芽細胞

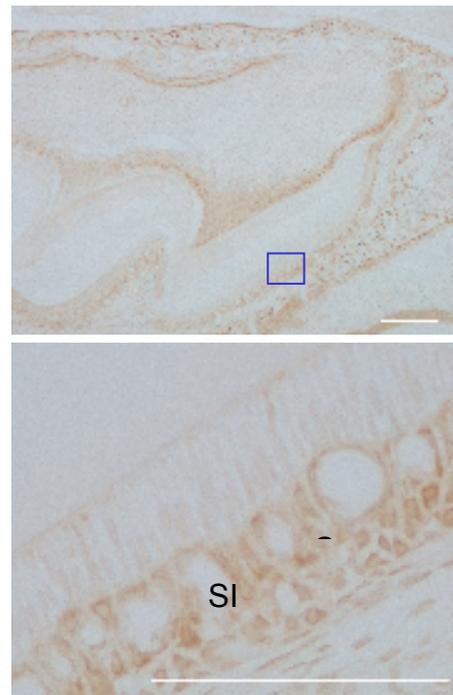


図11 硬組織形成期 P7 マウス臼歯歯胚領域における CNA $\alpha$ サブユニットの発現。上段の青枠内を拡大して下段に示す。上段のスケールバーは 200 $\mu$ m。下段のスケールバーは 100 $\mu$ m。SI：中間層

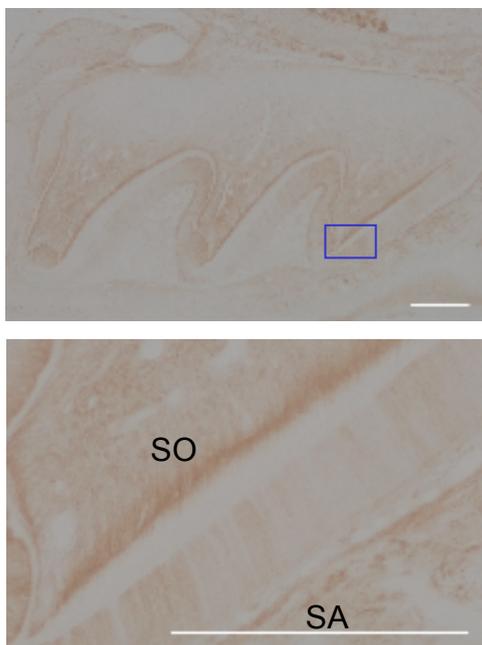


図10 硬組織形成期 P3 マウス臼歯歯胚領域における CAN $\beta$ サブユニットの発現。上段の青枠内を拡大して下段に示す。上段のスケールバーは 200 $\mu$ m。下段のスケールバーは 100 $\mu$ m。SA：エナメル芽細胞 SO：象牙芽細胞

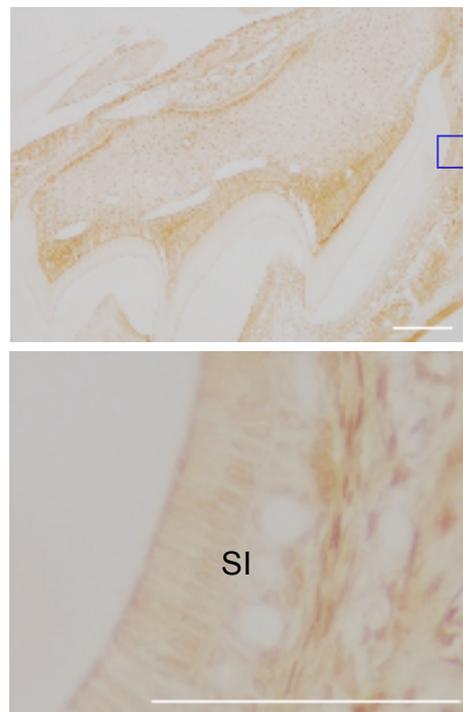


図12 硬組織形成期 P7 マウス臼歯歯胚領域における CAN $\beta$ サブユニットの発現。上段の青枠内を拡大して下段に示す。上段のスケールバーは 200 $\mu$ m。下段のスケールバーは 100 $\mu$ m。SI：中間層

図9から図12に示すように硬組織形成期歯胚にはCNA $\alpha$ 、CNA $\beta$ はエナメル芽細胞、中間層細胞、象牙芽細胞、歯髓細胞が発現していた。CNA $\alpha$ 、CNA $\beta$ は発現している細胞はほぼ同じであったが、細胞内での局在が異なっていた。

カルシニューリンは歯胚領域において細胞分化期、硬組織形成期に発現しており、歯胚の発育段階によって異なった役割を果たしている可能性が考えられる。また触媒サブユニットであるCNA $\alpha$ とCNA $\beta$ の細胞内局在は異なっており、CNA $\alpha$ とCNA $\beta$ は異なる役割を果たしている事も考えられる。

## 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 1 件)

① 大島昇平・八若保孝：歯の発育過程におけるカルシニューリンの発現. 第47回日本小児歯科学会大会、平成21年5月15日、大阪大学コンベンションセンター（吹田市）.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大島 昇平 (OSHIMA SHOHEI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：00374546

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし