

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20791343

研究課題名 (和文) 歯牙発生で減少した未解明遺伝子の発現・機能解析

研究課題名 (英文) Analysis for Down-regulated Unknown Gene in Odontogenesis

研究代表者

佐々木 穂高 (SASAKI HODAKA)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50433659

研究成果の概要 (和文) : マウスの歯の発生過程において、出生前後間で歯乳頭における歯牙形成能が消失することが知られている。出生前後間において減少した未解明遺伝子を、マイクロアレイ法を用いて検索した。発現が増加した遺伝子数が経時的に減少していくのに対して、減少した遺伝子は出生前後で最も多く認められた (3130 個)。これらの遺伝子群の中で、機能などが知られていない遺伝子は 1038 個あり、発現差が Fo1d 値 10 以上の減少を示したものが 16 個認められ、これらが歯牙の形態形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : It was known that important factors involved in odontogenesis in mouse dental papillae disappear between the pre- and post-natal stages of development. We examined unknown genes had down-regulated expression after birth by genome microarray analysis. The number of up-regulated genes showing an over 2-fold change decreased with time. On the other hand, the number of down-regulated genes was highest between pre- and post-natal (3,130 genes). Those were included 1,038 unknown genes, and it was recognized 16 genes, had significant reduction (fold value >10). These result suggest those down-regulated unknown genes were important factors in normal odontogenesis in dental papillae.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯学、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

口腔領域に限らず失われた組織の完全な再生 = 再生医療の研究が盛んに行われおり、特に倫理的な観点からも組織幹細胞による組織再

生が注目を集めている。近年、歯科領域においては歯胚由来の未分化な細胞を用いた歯牙の再生が報告されているが (Nakao K. et al., Nat Methods. 2007 Mar;4,227-30)、成熟した組織幹

細胞からの歯牙組織の再生は実現していない。成熟した歯原性間葉組織である歯髄・歯根膜組織における組織幹細胞の存在が報告されているが、その特異的マーカーの同定は未だなされておらず、歯牙発生のメカニズムの解明が重要な鍵となる。歯牙の発生は、歯原性の上皮-間葉の複雑な相互作用に基づいて行われており、現在もこれらに關与する数多くの遺伝子やタンパクについて研究がなされている。「歯牙形態形成の決定権」は、歯牙発育の初期段階(帽状期)で、上皮から間葉へと移行することが知られている。また、上皮と間葉の組み合わせ移植実験より、歯原性上皮の時期に関わらず、歯原性間葉の

「歯乳頭」における歯牙形態形成能が“出生前後の間で消失した”ことが報告されている(図1)(Palmer R. et al., *Arch Oral Biol*, 32, 281-9, 1987)。

そこで“**歯乳頭の歯牙形態形成能**”に關与する**遺伝子の発現が出生前後間で減少・消失した**と仮説のもとに、約3万個以上の遺伝子発現を検索することが可能なマイクロアレイを用いて、胎生 16、18 日 (E16,E18)と出生後3、10 日 (P3,P10)で比較検討を行ない歯牙形成能を持つ歯乳頭固有の未分化マーカーを同定することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロアレイ法を用いて出世前後間に減少・消失したと考えられる、“歯乳頭の歯牙形態形成能”に關与する遺伝子群を同定し、これらの中から現在、遺伝子の機能を示す Gene Ontology (GO) が登録されていない未解明遺伝子群を抽出、比較検討し歯牙形成能を持つ歯乳頭固有の未分化マーカーを同定することである。

これより抽出された遺伝子の局在、機能を解析することで、成熟した歯原性間葉組織からの幹細胞抽出や遺伝子導入による未分化度お

よび歯牙形成能の回復による歯牙再生へと貢献出来るもの考えられる。

3. 研究の方法

(1) 歯乳頭・歯髄組織の採取

胎生 16 日 (E16)、胎生 18 日 (E18)、生後 3 日 (P03) および生後 10 日 (P10) の ICR 系仔マウスより、チオペンタールナトリウム (ラボナール) にて麻酔後、下顎第一臼歯歯胚を採取し、Dispase (1.2 U/mL) にて、エナメル上皮・歯小嚢を剥離し、歯乳頭組織を採取した (各期間: n=20)。

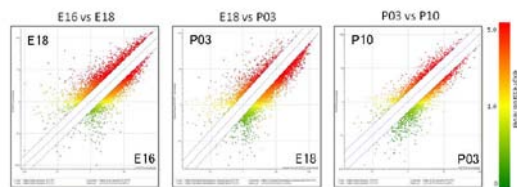
(2) マイクロアレイ

①ハイブリダイゼーション

採取した組織よりtotal RNAを抽出し、Agilent 2100 BioanalyzerにてRNAの質を確認した。各期間より採取したtotal RNA(200ng)をMEGAscript T7 Kitによる2-cycle法にてビオチン標識cDNAを生成した。各期間における約30,000個以上の遺伝子発現をAffymetrix社GeneChip mouse genome 430 2.0 arrayで45℃、16時間ハイブリダイゼーションをした。

②解析

ハイブリダイゼーションを行った Chip を Fluidic Station 450 にてスキャンし、GeneChip® Operating Software version 1.1 にて解析、GeneSpring software にて各期間における発現の比較検討を行った。



Genespring による各期間における遺伝子の発現比較

③Primer の設計

解析によって抽出された未解明遺伝子の塩基配列をAffymetrix社のデータベース Netaffyx

(<https://www.affymetrix.com/site/login/login.affx>)にて確認し、各遺伝子のPrimerをPrimer3(<http://frodo.wi.mit.edu/>)にて設計を行った。

Probe Set ID	PRIMER	PRODUCT SIZE
1430368_s_at	(F) ggactagtgtgctgccaagg	442
	(R) tctgagccctcactctcgat	
1446139_at	(F) agatcagagacgcctgcact	450
	(R) agaaccagcaaagacgagga	
1430222_at	(F) atcatggtatgctggggaag	401
	(R) atctccagcccaaaacaaag	
1457044_at	(F) catgatttctggattcagtgt	462
	(R) tttgaggtgtatcttctctcc	

4. 研究成果

(1) 増加・減少した遺伝子数

胎生期間 (E16~E18)、出生前後間 (E16~P03)、生後期間 (P03~P10) において発現差 Fold 値 2.0 以上の減少および増加した遺伝子数の検索を行った (表 1)。全遺伝子を対象とした場合、Up-regulate した遺伝子数は経時的に減少していくのに対して、Down-regulate した遺伝子数は、**出生前後期間で約 3,000 個と最も多く認められた**。これらの遺伝子の中で、現在、遺伝子の機能を示す Gene Ontology (GO) が登録されていない未解明遺伝子の検索を行った所、全遺伝子の約 1/3 に相当する 1,038 個が抽出された。

表1. 各期間における発現が減少・増加した遺伝子数

	Down-regulated	Up-regulated
E16~E18	2,269 (862)	1,679 (910)
E18~P03	3,130 (1,038)	681 (424)
P03~P10	1,337 (492)	860 (408)
	全遺伝子数 (未解明遺伝子数)	

(2) Down-regulate した未解明遺伝子の抽出

胎生期間で Down-regulate した 862 個の未解明遺伝子のうち、発現差 Fold 値が 10 以上を示した遺伝子は 16 個認められた (表 2)。出生前後間で Down-regulate した 1038 個の未解明遺伝子のうち、発現差 Fold 値が 10 以上を示した遺伝子は 16 個認められた (表 3)。

表2. 胎生期間で Fold 値>10 の未解明遺伝子

Probe Set ID	Gene Title	Fold
1455498_at	-	40.01
1455257_at	-	38.94
1445379_at	-	32.5
1459956_at	-	26.49
1439711_at	-	23.46
1435628_x_at	-	20.18
1441539_at	-	16.62
1434952_at	-	16.48
1459646_at	-	16.2
1443811_at	-	15.64
1459849_x_at	5730538E15Rik	14.95
1460163_at	-	14.05
1446332_at	-	12.3
1444874_at	-	12.17
1442571_at	-	11.83
1447040_at	-	11.63
1458505_at	-	10.64

表3. 出生前後期間で Fold 値>10 の未解明遺伝子

Probe Set ID	Gene Title	Fold
1430368_s_at	1700019D03Rik	33.22
1446139_at	-	26.71
1430222_at	9130007G19Rik	22.26
1457044_at	4732474O15Rik	18.23
1437469_at	A030007D23Rik	16.1
1441834_x_at	-	16.05
1457202_at	-	15.97
1449589_x_at	2610020O08Rik	14.76
1445642_at	4930540I23Rik	13.36
1431310_s_at	4930595O22Rik	12.96
1457981_x_at	2810418N01Rik	12.52
1446764_at	-	11.74
1443507_at	-	11.69
1436620_at	F630025I20Rik	10.59
1440158_x_at	-	10.48
1452679_at	2410129E14Rik	10.19

(3) 出生前後間で Down-regulate した未解明遺伝子の発現パターン

出生前後間で Fold 値 10 以上の発現減少を示した遺伝子群の、発現パターンを検討するために線グラフによる画像標識 (図 1) と発現の有無を示す Flag (P:発現有、A:発現無) の経時的変化 (表 4) を検討した。

発現傾向として、もっとも多かったのは胎生期間で発現を開始し、出生前後間で消失し、出生後は消失したままである A→P→A→A のパターンで、11 個の遺伝子群で認められた。

図1. 出生前後に減少した未解明遺伝子の発現パターン

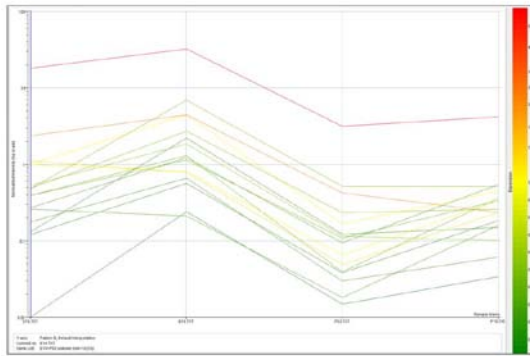


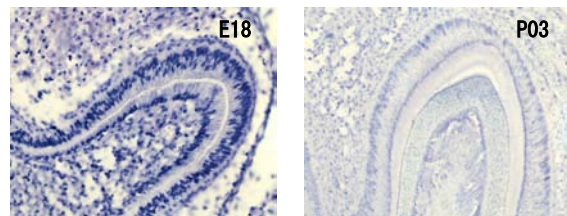
表4. 出生前後に減少した未解明遺伝子の Flag 値

Probe set ID	E16	E18	P03	P10
1430368_s_at	A	P	A	A
1446139_at	A	P	A	A
1430222_at	A	P	A	A
1457044_at	A	P	A	A
1437469_at	A	P	A	A
1441834_x_at	A	P	A	A
1457202_at	P	P	A	A
1449589_x_at	A	P	A	A
1445642_at	P	P	P	P
1431310_s_at	A	P	A	A
1457981_x_at	P	P	A	A
1446764_at	A	P	A	A
1443507_at	A	P	A	A
1436620_at	A	P	A	A
1440158_x_at	P	P	P	A
1452679_at	P	P	P	P

(4) まとめ

マウス歯乳頭・歯髄における歯牙発生で発現が down-regulate した遺伝子は、出生前後間で約 3,000 個と最も多かった事から、これらの遺伝子の減少・消失が“歯牙形成能”に関与していると考えられる。また、これらの遺伝子群の中には、現在も Gene Ontology に機能が登録されていない未解明遺伝子が約 1/3 に相当する 1,038 個が抽出された。これらの未解明遺伝子群のうち特に著しい発現差 (Fold 値 > 10) を示した 16 個の遺伝子の発現傾向は、出生直前の E18 に発現を開始し、出生後 (P03) には減少をきたすパターンが多く認められた事から、これらの遺伝子が歯牙の形態形成能に関与することが示唆された。

今後は、より多くの未解明遺伝子群を抽出し、RT-PCR や in situ hybridization によって歯胚内における発現局在や他組織には発現していない歯牙発生における固有の遺伝子の同定し、更なる考察を行いたい。



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 1 件)

Sasaki H, Muramatsu T, Kwon HJ, Yamamoto H, Hashimoto S, Jung HS, Shimono M.

Down-regulated genes in mouse dental papillae and pulp.

J Dent Res. 2010 Jul;89(7):679-83. Epub 2010 May 6.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 穂高 (SASAKI HODAKA)

東京歯科大学・歯学研究科・助教

研究者番号: 50433659