

平成 23 年 5 月 20 日現在

機関番号：3 2 7 1 0

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：2 1 7 9 2 1 0 2

研究課題名 (和文) am3 遺伝子の同定と SNPs を用いたリスク診断法確立のための基礎的研究

研究課題名 (英文) Identification of am3 gene and an underlying study for establishment of risk diagnostic procedure using SNPs

研究代表者

成山 明具美 (NARIYAMA MEGUMI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90440304

研究成果の概要 (和文): 第三臼歯の欠如を高率に発症する EL マウスを用いて、第三臼歯先天欠如の主因遺伝子の同定を試みた。連鎖解析より原因遺伝子が存在している可能性が高いことが示されている am3 領域に存在する既知の候補遺伝子 (*Lef1*, *Egf*) と am3 領域以外で歯の発生に関する既知の遺伝子 (*Shh*, *Pitx2*, *Bmp2*, *Bmp4*) の mRNA 発現量を Real-time PCR 法により解析した。その結果、*Lef1*, *Egf*, *Bmp2*, *Bmp4* が第三臼歯先天欠如に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文): The present study attempted to define genes causing an absence of the third molars in EL mice with the majority exhibiting the absence of all third molars. I analyzed the mRNA expressions of candidate genes (*Lef1*, *Egf*) in the am3 locus indicated with linkage analysis and other candidate genes (*Shh*, *Pitx2*, *Bmp2*, *Bmp4*) in the EL and control mice using Real-time PCR. The results of PCR suggest that *Lef1*, *Egf*, *Bmp2*, and *Bmp4* are involved in the absence of the third molars in EL mice.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正小児系歯学

キーワード：分子遺伝学、歯の発育異常、am3 遺伝子、リスク診断、EL マウス

## 1. 研究開始当初の背景

歯の先天欠如はヒトの歯の発育異常のうち

最も一般的なものの一つであり、歯列や咬合の異常を引き起こす原因の一つとされてい

る。歯の発生に関する遺伝子については国内外で様々な研究が行われており多く報告されているが、歯の先天欠如のメカニズムについての詳細は明らかではない。

朝田らは、てんかんのモデルマウスである EL マウスが第三臼歯の欠如を高率に発症するモデルマウスとなりうることを報告した (Asada et al., *Pediatric Dental Journal* 10(1): 19-22, 2000)。遺伝的交配実験から、EL マウスにおける歯の欠如は常染色体劣性遺伝であり、複数の遺伝子が関与している可能性が示唆されたが (Nakamura, Asada et al., *Jpn. J. Pediatr. Dent.* 38(3): 502-508, 2000) さらに、連鎖解析を行ったところ第3番染色体の D3Mit13 (61.8 cM) と D3Mit125 (66.2 cM) の間の 4.4 cM の間に第三臼歯欠如の主要な遺伝子が存在している可能性が高いことを明らかにし、*am3* と名付けた (Shimizu, Han, Asada et al., *J. Dent. Res.* 84(4): 315-319, 2005)。この *am3* 領域には、歯の発育に重要な役割をはたしている *Lef1*, *Egf* が存在しているので、EL マウスとコントロールマウスとの間で *Egf* と *Lef1* のすべての exon の塩基配列を比較したところ、完全に一致した。しかしながら、intron と regulatory region についてのシーケンスは行われていないため、これらの領域での mutation の可能性も考えられる。

また、第3番染色体の *am3* 領域に存在する既知あるいは未知の遺伝子が第三臼歯の欠如に中心的な役割を果たしていることは明白であるが、第3番染色体の *am3* 領域外や、その他の染色体に存在する複数の遺伝子との相互作用により、第三臼歯歯胚の発育停止や消失をもたらしている可能性も十分に示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、第3番染色体の *am3* 領域にあると予想される第三臼歯先天欠如の主要な原因遺伝子を同定し、さらに、single-nucleotide polymorphisms (SNPs) を用いた歯の先天欠如の遺伝子リスク診断を行うための基礎的なデータを得ることである。

その第一歩として以下のことを目的とした。

(1) Real-time PCR 法を用いて、歯の発

育過程における第三臼歯領域での *am3* 領域に存在する歯の発育に関する既知の候補遺伝子である *Lef1*, *Egf* の発現量について、EL マウスとコントロールマウスとの違いを明らかにする。

(2) *am3* 領域以外に存在する歯の発生に関する既知の遺伝子についても、Real-time PCR 法を用いて、歯の発育過程における第三臼歯領域での発現量について、EL マウスとコントロールマウスとの違いを明らかにする。

(3) 上記実験(1)、(2)の結果より、第三臼歯先天欠如の主要な原因遺伝子候補を選択する。

## 3. 研究の方法

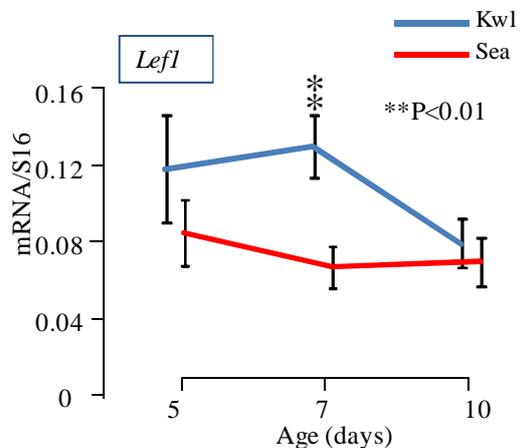
(1) 5、7、10日齢の EL/KWL マウスおよび EL マウスを安楽死させ、下顎骨を摘出し、第三臼歯相当部の組織を取り出し、mRNA を分離する。

(2) Real-Time PCR 法を用いて、マウス第三臼歯における *am3* 領域に存在する既知の候補遺伝子である *Lef1*, *Egf* の mRNA 量を測定した。

(3) (2)と同様に、Real-TimePCR 法を用いて、*am3* 領域以外で歯の発生に関する既知の遺伝子 (*Shh*, *Pitx2*, *Bmp2*, *Bmp4*) の mRNA 量を測定した。

## 4. 研究成果

(1) 第3番染色体の *am3* 領域に存在する *Lef1*, *Egf* については EL と EL/KWL の間で、7日齢 ( $p < 0.01$ ) において統計的有意差が認められた (図1)。



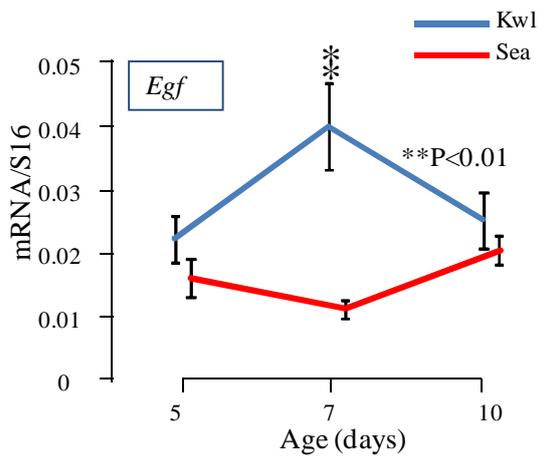


図 1 : *Lef1*、*Egf* の mRNA 発現量

( 2 ) *am3* 領域以外に存在する歯の発生に関する既知の遺伝子 *Bmp2* については 5 日齢 ( $p<0.05$ )、*Bmp4* については 7 日齢 ( $p<0.05$ ) において統計学的に有意な差が認められた ( 図 2 )。

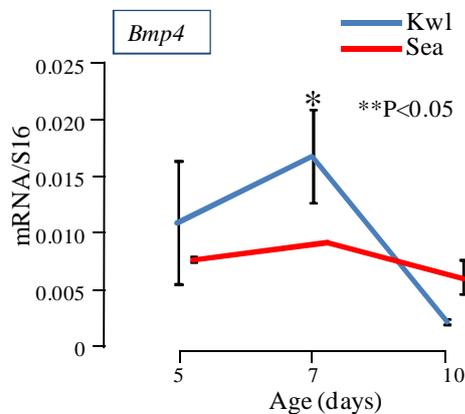
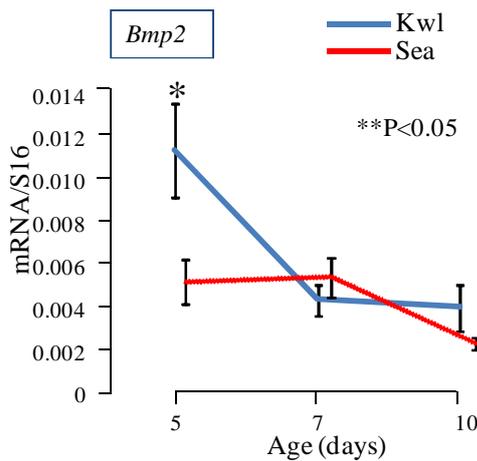


図 2 : *Bmp2*、*Bmp4* の mRNA 発現量  
( 3 ) また、*am3* 領域以外に存在する歯の発

生に関する既知の遺伝子 *Shh*、*Pitx2* については統計学的に有意な差は認められなかった ( 図 3 )。

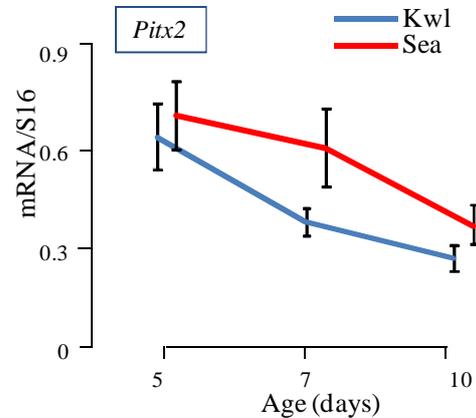
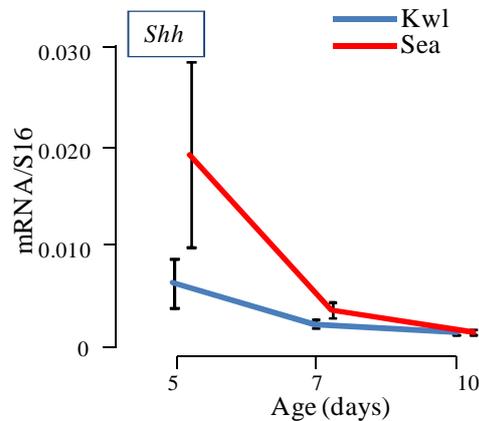


図 3 : *Shh*、*Pitx2* の mRNA 発現量

( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) の結果から、*am3* 領域に存在する既知の候補遺伝子 (*Lef1*、*Egf*) と *am3* 領域以外で歯の発生に関する既知の遺伝子 (*Bmp2*、*Bmp4*) が第三臼歯先天欠如に関与し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 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Megumi Nariyama, Yuki Kota, Itaru Tashima, Tadafumi Tomohiro, Akira Yamane and Yoshinobu Asada: Effect of third molar absence on development of masticatory muscles in EL mice. *Pediatric Dental Journal*, 査読有, Vol.20, No.2, 2010, pp.122-129

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

森 愛美, 成山明具美, 阿保徳寿, 山根明, 朝田芳信: 咬筋の神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体クラスター形成、平成 22 年度、一般社団法人日本小児歯科学会秋季大会、2010.12.2-3、郡山市民文化センター

Yamane A, Nariyama M, Kota Y and Asada Y: Lack of teeth and expression of myosins in masticatory muscles, 58th annual meeting of JADR, 2010.11.20, Kyushu Dental College, Kitakyushu

Nariyama M, Kota Y, Yamane A, Tomohiro T and Asada Y: Effects of Lack of Occlusal Activity on Masticatory Myogenesis, 88th General Session & Exhibition of the IADR, 2010.7.14-17, Centre de Convencions Internacional Barcelona

成山明具美, 古宇田ゆき, 田島 格, 友廣忠文, 山根 明, 朝田芳信: マウス第三臼歯欠如が咀嚼筋の発達過程に及ぼす影響、第48回日本小児歯科学会大会、2010.5.19-20、名古屋国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

成山 明具美 (NARIYAMA MEGUMI)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号: 90440304

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし