

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592807

研究課題名(和文) アメロジェニンの分布および硬組織形成における役割に対する検討

研究課題名(英文) The study of the gene distribution and the role in hard tissue formation of amelogenin in

研究代表者

山田 嘉重 (Yamada, Yoshishige)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：40360127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：In situ hybridization法を用いた遺伝子解析において、脳、腎臓、眼、骨関連組織などの組織にもアメロジェニン遺伝子の発現が認められることが確認された。これら組織におけるアメロジェニン遺伝子発現は、切歯のエナメル芽細胞における遺伝子発現量に比べて顕著に微量であることが確認された。またそれら組織におけるアメロジェニン遺伝子の発現量は胎生初期よりも胎生末期に強くなる傾向が確認された。

研究成果の概要(英文)：According to the results of in situ hybridization, amelogenin gene expression was observed several non tooth related tissue such as brain, kidney, eye and bone related tissues. The amelogenin gene expression in these tissues, were a significant small amount of gene expression compared with gene expression in ameloblast of incisor. The tendency of the expression level of the amelogenin gene in the tissue they become strong in the late gestation than early fetal period has been confirmed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：アメロジェニン マウス胎仔 エクソン In situ hybridization法

## 1. 研究開始当初の背景

アメロジェニン(AMBP)は歯組織の構成タンパク質であるエナメル質の主用タンパク質であるが、近年それ以外の領域にその存在が報告されている。2006年にはLi Yら(Eur J Oral Sci, p190-193)は生後10日齢マウスの脳、眼、頭蓋骨、皮膚、(長骨、肝臓、腎臓、心臓)にLLARPアメロジェニン相当のアメロジェニン遺伝子の発現を報告、Deutsch Dら(Eur J Oral Sci, p183-189)も生後5~6週齢のラットの脳にM194、M180アメロジェニン遺伝子の発現を報告している。2009年にはSato Yら(Leg Med, p455-457)がヒト心臓大動脈組織にアメロジェニン遺伝子の発現を報告している。我々も、生後8週齢のマウスの脳、心臓、肺、胃など幾つかの歯組織とは関係のない軟組織中にアメロジェニンの存在をPCR法にて確認している。しかしそれらの組織における働きについては未だ明確にされていない。これまでの幾つかの報告で様々な組織でアメロジェニンの発現が報告されているが、我々の研究を含め、すべてPCR法による確認であり組織切片上では確認はなされていない。アメロジェニン遺伝子を発現している組織の分布が判ればその機能的働きも推察できる可能性が高い。我々のこれまでの200bp前後のサイズに増幅したアメロジェニン遺伝子で*in situ* PCR法を試みているが明確な遺伝子発現像を得ることが出来ていない。その理由としてはパラフィン切片作製過程に

おけるRNAの断片化により、施行しているPCRの長さよりRNAが短く断片化されてしまい、遺伝子の増幅が出来ないものと思われる。また微細に発現が認められた資料においても、加熱反応処理中にパラフィンがスライドガラスからはがれてしまい、各組織においてアメロジェニンの遺伝子を詳細に確認することが困難な状況である。

従って、パラフィン包埋処理中のRNA分解を極力軽減して、*in situ* PCR法ではなく、用いて*in situ* hybridization法にて発現を確認する方が、正しい結果を得られるものと結論づけた。

また、ここ数年アメロジェニンに新たに追加のエクソン(エクソン8.9)が有る可能性が報告された。

## 2. 研究の目的

PCRにてアメロジェニン遺伝子の増幅が可能か幾つかのサイズのプライマーを作成し、そのプライマーにて増幅された遺伝子を用いて*in situ* hybridization法に使用するアメロジェニンプローブを製作して、*in situ* hybridization法にてアメロジェニン遺伝子発現の有無および発現状態を組織切片から確認することで、体の中の様々な組織に対してアメロジェニンの遺伝子やタンパク質がどのように働きかけるのかを推測することを目的とした。その際、発育時期の違いによりアメロジェニン遺伝子発現に差異が生じるかを検討した。

また、プローブが含まれるエクソンのサイズ、領域の違いにより遺伝子発現の程度、組織間の発現分布の違いが生じるのかも検討することも目的とした。

### 3. 研究の方法

PCR から得られた遺伝子から幾つかのサイズのアメロジェニン遺伝子に対するプローブを作成した。アメロジェニン遺伝子のエクソンの違いから、(1) エクソン 1-7 間のプローブ、(2) エクソン 1-9 間のプローブ、(3) エクソン 8、9 のみを含むプローブの 3 種類の長さの違うプローブを作成した。また本研究には胎生 10.5 日齢、14.5 日齢、18.5 日齢の異なる日齢のマウスを使用した。屠殺後各マウスは可能な限り RNA が分解しないように細心の注意をはらいながらパラフィン切片を作成した。

その後上記した 3 種類のアメロジェニンプローブを使用してそれぞれの組織切片上にて *in situ* hybridization 法を施行し、各組織の遺伝子発現の有無を光学顕微鏡にて観察した。

### 4. 研究成果

胎生 10.5 日齢、14.5 日齢、18.5 日齢の全ての時期において、エクソン 8、9 からなるプローブでは遺伝子発現が認められなかった。この結果の意味することは、遺伝子発現の陽性反応が各組織になかったわけではなく、この両領域間では遺伝子の長さが短すぎる (200bp 未満) のため、*in situ* hybridization 法では検出できなかったものと思われ、のではないと推測される。

他の 2 種類のプローブにおいては若干の発現パターンの違いが見られたものの、殆ど同程度の遺伝子発現が確認された。

胎生 10.5 日齢においては、中脳、肺、肝臓、神経節に遺伝子発現が認められたが、その発現程度は微細であった。エクソン 1-7 とエクソン 1-9 との 2 種類のプローブでは発現分布に差異は認められなかったが、発現量はエクソン 1-9 を含むプローブの方が強い傾向を示した。

胎生 14.5 日齢になると、遺伝子の陽性反応は胎生 10.5 日齢より明確に示す様になった。舌、腎臓、膵臓、脾臓、神経節、骨組織にもアメロジェニンの遺伝子反応が認められるようになった。しかし肝臓では遺伝子発現は殆ど認められなかった。

エクソン 1-7 のプローブとエクソン 1-9 のプローブの違いにより、遺伝子発現の分布に違いは認められなかったが、肺においてはエクソン 1-7 の方が、神経節と骨組織においてはエクソン 1-9 プローブの方が強く遺伝子発現が観察された。

胎生末期である、胎生 18.5 日齢では、脳、神経節、骨組織、鼻腔、皮膚、胸腺、腸管、肺、心臓、精巣、卵巣に明確なアメロジェニン遺伝子発現が認められた。舌には遺伝子発現は認められず、肝臓、膵臓、眼には微細な発現が観察された。エクソン 1-7 のプローブとエクソン 1-9 のプローブの違いでは、エクソン 1-7 のプローブの方が、腎臓、胸腺、肝臓、皮膚における遺伝子発現は強く示された。一方

眼、脳、鼻腔では、エクソン 1-9 プローブを使用した方が、遺伝子反応が強く観察された。

これらの結果より、アメロジェニンが歯組織以外の様々な軟組織に存在することが、組織切片上でも確認された。またその発現が胎生初期より末期に明確に認められることから、アメロジェニンはそれら組織の発生に關与するのではなく、機能の恒常維持に關与している可能性が示唆された。また、新たに発見されたエクソン 8、9 を含むプローブと従来のエクソン 7 までのプローブにおいて殆どの組織で明確な遺伝子発現に差が認められなかったが、幾つかの組織でアメロジェニン遺伝子発現の程度に違いが認められたことから、エクソン 8、9 の存在は幾つかの組織に対して独自の働きを有する可能性も考えられるが、後さらなる検討が必要になるものと思われる。

#### 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)

山田嘉重。胎生マウスにおけるアメロジェニン遺伝子発現様式の検討。第 14 回エナメル質比較発生学懇話会 8 月 29、30 日、新潟 2013 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

山田 嘉重 (YAMADA Yoshishige)  
昭和大学・歯学部・講師  
研究者番号：40360127

##### (2)研究分担者

増田 宜子 (MASUDA Yoshiko)  
昭和大学・歯学部・准教  
研究者番号：10297038

川中 岳雄 (KAWANAKA Takao)

昭和大学・歯学部・助教  
研究者番号：10365702

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：