

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792100

研究課題名（和文）Bcl11b 変異による過剰歯形成機構

研究課題名（英文）Mechanisms of extra-molar development by *Bcl11b* mutation

研究代表者

葛城 美徳 (KATSURAGI YOSHINORI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60401759

研究成果の概要（和文）：我々は *Bcl11b*^{S826G/KO} マウスが過剰歯形成や上顎切歯低形成を示すことを見いだした。この変異体マウスでは切歯エナメル上皮幹細胞領域である laCL の萎縮、細胞増殖低下や LRC 減少が確認された。*Bcl11b* は FGF や Shh 経路に直接作用はせず、エナメル芽細胞前駆細胞や幹細胞において内因的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have showed that *Bcl11b*^{S826G/KO} mice exhibited extra-molars and hypoplastic maxillary incisors. In incisors of this mutant, hypoplasia of laCL which contains stem cells of ameloblast lineage, impaired proliferation of TA cells, and reduced number of LRC were observed. Our data suggest that *Bcl11b* is not directly related to the FGF and Shh signaling but is intrinsic to ameloblast progenitors and possibly stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

(1) *Bcl11b* はマウス胸腺リンパ種の解析から当教室で単離された遺伝子で、ジンクフィンガーをもつ転写制御因子をコードする。我々は *Bcl11b* が胸腺細胞の正常な分化に必須であることや、この遺伝子欠失が胸腺リンパ腫発症のごく初期からみられることを示してきた。また、この遺伝子は大腸がん抑制遺伝子として働くことを *Apc*^{Min/+} マウスを用いた研究やヒト大腸がん腫瘍部 DNA の解析により明らかにした。

(2) 我々は RIKEN の ENU 変異体リソースから *Bcl11b* 矮小型変異アリルとして *Bcl11b*^{S826G} を単離し、*Bcl11b*^{S826G/KO} マウスの解析に着手した。この変異体では体が一回り小さく、これまでわかっていた胸腺や腸管の表現型以外に、①本来臼歯のない diastema 領域における過剰歯形成、②上顎切歯の低形成③上下切歯の咬合異常、といった歯における興味深い表現型を見いだした。

2. 研究の目的

歯の過剰歯形成過程における *Bcl11b* の機能を調べること（前述①）が本研究の主題であったが、並行して研究を行っていた切歯における *Bcl11b* の役割（前述②）に関して主に研究を行った。以下、①と②のテーマで分けて記載する。

3. 研究の方法

(1) 過剰歯形成に関して
臼歯歯胚 (E13.5～E18.5) における *Bcl11b* の発現確認とその標的遺伝子と考えられる β -catenin の発現を調べた。また、過剰歯の形態的特徴についても確認した。

(2) 切歯低形成に関して

① EPMA 解析や microCT 等で切歯の低形成を確認した。また、H.E 染色により組織的・形態的な異常の有無を確認した。

② 免疫染色や ISH により、エナメル芽細胞、

象牙芽細胞の分化に異常が無いか調べた。
 ③ Ki67 や BrdU 染色により TA 細胞の増殖に差がないか調べた。アポトーシスについても cleaved caspase-3 の免染で確認した。

④ LRC (Label retaining cells : 長期ラベル保持細胞) は幹細胞の 1 つとされている。そこで P3-P5 にかけての BrdU 連続投与後、2 週間でサンプリングを行い、BrdU-LRC をカウントすることで幹細胞数への影響の有無を調べた。

⑤ *Bcl11b* およびその標的遺伝子とされる β -catenin や p27 等に関して変異体マウスにおける laCL 周辺での発現パターン変化の有無を調べた。

また、マウス laCL 由来の細胞株である mHAT-9a において *Bcl11b* が β -catenin や p27 等のプロモーターに対して転写抑制因子として働いているかを Luc アッセイにより確認した。

⑥ 歯の発生や維持に関わるとされる FGF3 や Shh 経路に変化が無いか調べるため、FGF3, Shh, Gli1, Ptch1 の ISH を行った。

4. 研究成果

(1) 過剰歯形成に関して

Bcl11b^{S826G/KO} マウスの上顎あるいは下顎の第一臼歯 (M1) の近心側に高頻度で臼歯状の過剰歯が確認された。microCT によりその構造を比較したところ、M1 から M3 の臼歯の大きさや咬頭の形態には大きな差異は認められなかった (図 1)。

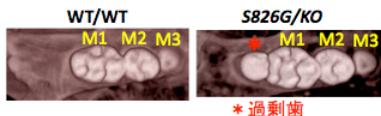


図 1 : 過剰歯の形態

臼歯発生過程を免疫染色で調べた結果、*Bcl11b* は上皮全般に発現しており、E13.5 では口腔上皮や歯胚プラコードに、それ以降では外エナメル上皮側でより強い発現が認められた。また、興味深いことに *Bcl11b* の発現の強弱に相反して β -catenin の発現が認められた。また、E14.5 においては *S826G/KO* の臼歯歯胚領域が WT/WT と比較して近心側に拡大しており、この領域拡大が過剰歯形成をもたらしたと考えられる。

(2) 切歯低形成に関して

① EPMA 解析の結果、切歯のエナメル質の低形成が確認された (図 2)。

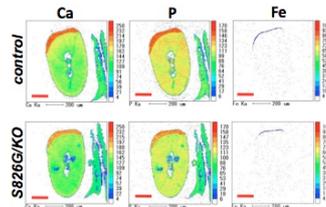


図 2 : 切歯の EPMA 解析

また、H.E 染色により *S826G/KO* ではエナメル上皮細胞系の幹細胞を含むとされる laCL 領域の萎縮やエナメル基質の早期合成などが認められた (図 3)。

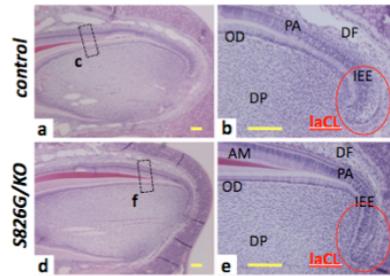


図 3 : 上顎切歯の H.E 染色 (P21)

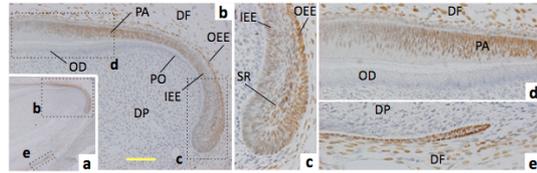


図 4 : 野生型上顎切歯における *Bcl11b* 発現

Bcl11b はエナメル芽細胞前駆細胞 (PA) や laCL、外エナメル上皮 (OEE) に強く発現するが内エナメル上皮 (IEE) では弱く発現している (図 4)。

② 変異体におけるエナメル基質の早期合成より、エナメル芽細胞の早期分化が推測された。そこでエナメル芽細胞分化マーカーである Amelogenin, Enamelin, Ameloblastin の発現や象牙芽細胞マーカーである *Dsp*, Nestin の発現を免疫染色や ISH により調べた。その結果、いずれのマーカー発現とも変異体マウスにおいても laCL に近く本来比較的

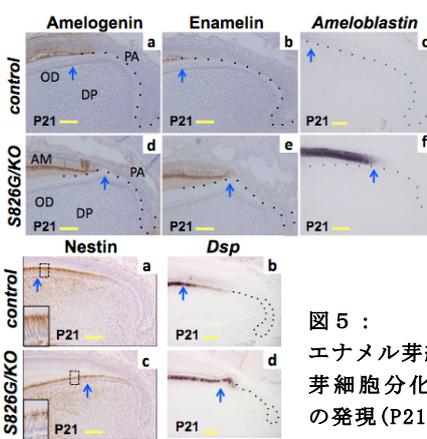


図 5 : エナメル芽細胞・象牙芽細胞分化マーカーの発現 (P21)

分的に未熟な領域から急激な発現がみられた (図 5)。
 ③ Ki67 や BrdU の免染により、P21 における細胞増殖への影響を調べた結果、この変異体マウスでは laCL 近傍の本来増殖の盛んなエナメル上皮細胞 (TA 細胞や PA 細胞) の細胞分裂が著しく低下していた (図 6)。*S826G/KO* 変異体におけるこのような増殖低下 (図 6) や分化の早期化 (図 5) は P21 では確認できたが、P5 では確認できなかった。これは *Bcl11b* の成体切歯維持における機能を示すと考えられる。

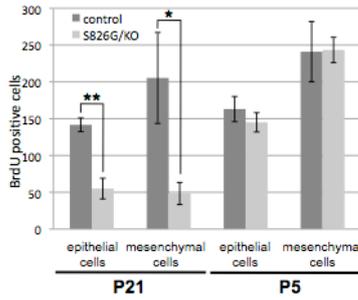


図 6 :
P21 と P5 における増殖細胞数 (BrdU+)

なお、野生型と変異体の間でアポトーシスには顕著な差が認められなかった。

④ 幹細胞を含む laCL 領域の萎縮 (図 3) や TA 細胞の減少 (図 6) から、laCL におけるエナメル芽細胞の幹細胞減少が示唆された。

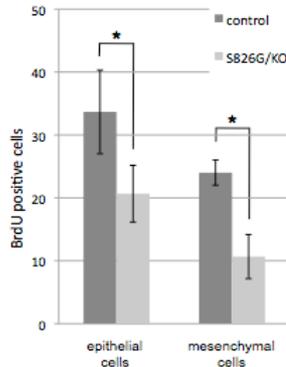


図 7 :
LRC 数の比較

そこで BrdU 連続投与実験により BrdU-LRC 数を比較した (図 7)。

その結果、S826G/KO 変異体では上皮・間葉系ともに LRC 減少が認められた。LRC は幹細胞の一部しか標識できないことや、その 1 つの指標でしかないが、この結果は変異体の切歯におけるエナメル上皮幹細胞の低下を示唆すると考えられる。

⑤ S826G/KO 変異体切歯における Bcl11b 発現やその標的遺伝子とされる β -catenin、p27、p57 について免染を行った (図 8)。

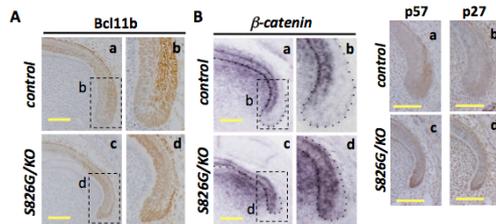


図 8 : Bcl11b とその標的遺伝子産物の発現

その結果、S826G/KO 変異体の切歯では本来 Bcl11b 発現の低下している IEE 領域や laCL の先端部分に Bcl11b 発現が強い細胞が多く認められた。また同様の領域で β -catenin や p27、p57 の発現亢進が認められた。これは Bcl11b の機能低下によって Bcl11b 標的遺伝子の転写抑制が解除された結果と言えるかもしれない。実際に Bcl11b が laCL の細胞においてこれらの遺伝子に作用するか確認するため、laCL 由来の細胞株である mHAT-9a におけるリポーターアッセイを行った。その結果、Bcl11b は β -catenin、p27 等のプロモーター

に抑制的に作用しており、S826G 変異体ではその抑制活性の著しい低下が確認できた (図 9)。

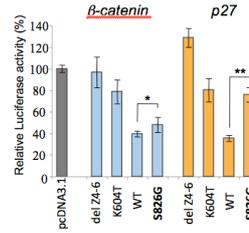


図 9 :
mHAT-9a における β -catenin および p27 プロモーターに対する Bcl11b の転写抑制活性

S826G/KO 変異体切歯では Bcl11b の機能低下によってその標的遺伝子の発現抑制が効かなくなり、 β -catenin、p27 上昇をもたらし、切歯低形成を引き起こしたのかもしれない。

⑥ 最後に歯の発生や維持に必要なとされる FGF3 や Shh 経路に変化が無いかわかるため、FGF3、Shh、Gli1、Ptc1 の ISH を行った (図 10)。その結果、変異体において顕著な低下を示すものは無く、大きな差異は認められなかったことから、Bcl11b^{S826G/KO} 変異体における切歯低形成は、FGF や Shh 経路に直接的に依存するものではなく、Bcl11b 発現細胞であるエナメル芽細胞の幹細胞や TA 細胞低下がその主因ではないかと考えられる。

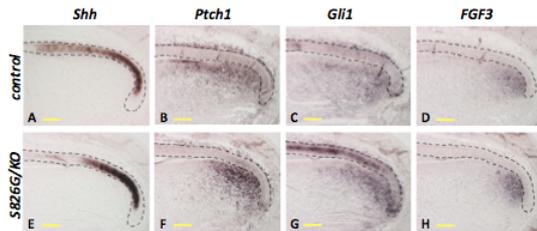


図 10 :
FGF3 や Shh シグナルマーカーの ISH

* (2) に関しては Mechanisms of Development 誌に掲載 (印刷中)

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 3 件)

(1) Katsuragi Y, Anraku J, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Obata M, Mishima Y, Sakuraba Y, Gondo Y, Kodama Y, Nishikawa A, Takagi R, Ohshima H, Kominami R. Bcl11b transcription factor plays a role in the maintenance of the ameloblast-progenitors in mouse adult maxillary incisors. Mechanisms of Development (*in press*) 査読有 DOI: 10.1016/j.mod.2013.05.002

(2) Go R, Hirose S, Katsuragi Y, Obata M, Abe M, Mishima Y, Sakimura K, Kominami R. Cell of origin in radiation-induced premalignant

thymocytes with differentiation capability in mice conditionally losing one Bcl11b allele. (2013). Cancer Science [Epub ahead of print]. 査読有 DOI: 10.1111/cas.12193.

(3) Go R, Takizawa K, Hirose S, Katsuragi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R. Impairment in differentiation and cell cycle of thymocytes by loss of a Bcl11b tumor suppressor allele that contributes to leukemogenesis. (2012). Leukemia Research. 36.1035-1040. 査読有 DOI: 10.1016/j.leukres.2012.04.028

〔学会発表〕(計6件)

1. Katsuragi Y, Anraku J, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Mishima Y, Obata M, Sakuraba Y, Gondo Y, Takagi R, Oshima H, Kominami R. Bcl11b transcription factor plays a role in the homeostasis of the ameloblast-progenitors in mouse adult maxillary incisors 第35回日本分子生物学会 2012年12月12日 福岡市

2. 葛城美徳, 坂牧僚、小幡美貴、三嶋行雄、大塚健介、木南凌 放射線照射後の腸上皮における Bcl11b の働き 第55回日本放射線影響学会 2012年09月07日 仙台市

3. Katsuragi Y, Anraku J, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Mishima Y, Sakuraba Y, Gondo Y, Takagi R, Oshima H, Kominami R. Bcl11b transcription factor controls the formation and maintenance of the ameloblast-lineage cells in mouse adult maxillary incisor 第34回日本分子生物学会 2011年12月13日 横浜市

4. 葛城美徳, 坂牧僚、小幡美貴、三嶋行雄、木南凌 Bcl11b の片アレル消失は γ 線照射後のマウス小腸上皮幹細胞の増殖を促進する 第54回日本放射線影響学会 2011年11月18日 神戸市

5. Katsuragi Y, Sakamaki A, Obata M, Mishima Y, Kominami R. Loss of a Bcl11b allele promotes proliferation of stem cells in the mouse small intestine after γ -irradiation. ICRR (国際放射線研究連合会議) 2011年8月31日 ワルシャワ (ポーランド)

6. 葛城美徳, 安楽純子、中富満城、依田浩子、三嶋行雄、桜庭喜行、権藤洋一、高木律男、大島勇人、木南凌 Bcl11b はエナメル芽細胞系譜の形成と維持に関与する モロシヌス研究会 2011年7月8日 ホテルベルナティオ (新潟県十日町)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛城 美徳 (KATSURAGI YOSHINORI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：60401759

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし