

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 21 日現在

機関番号：32710

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 年度

課題番号：23890222

研究課題名（和文） 樋状根成因に対する遺伝子相互作用の解明

研究課題名（英文） Gene interaction of morphogenesis for gutter-shaped root

研究代表者

田島 格（ TASHIMA ITARU ）

鶴見大学・歯学部・臨床助手

研究者番号：10612004

研究成果の概要（和文）：

本研究は、歯根の形態に影響を与える遺伝子の特定を目的に、樋状根を有する C57L/J 系統のマウスと、正常歯根を有する C57BL/6J 系統のマウスを用いて、10, 11, 12 の各日齢で免疫染色を行った。標的とした遺伝子は sonic hedgehog (*SHH*) と GLI-Kruppel family member GLI1 (*Gli1*) である。

C57L/J 系統と、C57BL/6J 系統のマウスの間で、歯根分岐部において *SHH* と *Gli1* は共に、発現パターンに差が認められた。このことから *SHH* 及び *Gli1* が属する *SHH* signaling pathway は、歯根の形態の決定に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to identify the gene for influencing to tooth root form using C57L/J strain mice (LJ mice) and C57BL/6J strain mice (B6 mice). We performed immunohistochemistry (IHC) to analyze the expression patterns of sonic hedgehog (*SHH*) and GLI-Kruppel family member GLI1 (*Gli1*) in postnatal days 10, 11, 12.

Expression patterns of *SHH* and *Gli1* showed differences in tooth root bifurcation area between LJ mice and B6 mice. It is suggested that *SHH* signaling pathway is involved to tooth root formation in C57L/J strain mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,100,000	330,000	1,430,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：免疫染色, 樋状根, *SHH* signaling pathway, C57L/J

1. 研究開始当初の背景

近年、歯の再生医療に関わる研究は急速に進み、早期の臨床への応用が期待されている。マウスにおいては、三次元的な細胞操作によって正常発達が可能な歯胚の再生方法 (Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T: The development of a bioengineered organ germ method. *Nature Methods* 2007;4:227-230) や、*in vitro* における歯の再生 (中原貴, 井出吉昭, 富永徳子, 石川博: 再生歯インプラントの実現に向けた歯根・歯周組織ユニットのインビトロ形成と移植評価 (会議録): 日本口腔外科学会誌:2010:56(suppl):133) が報告され注目されている。これらの技術を臨床に応用するためには、歯の形態の制御が必要であり、歯の形態形成に関与する遺伝子相互作用の解明が進められているが、歯根の形成に関する遺伝子情報は歯冠に比べて多くはない。

歯根の形態形成に関する遺伝子の研究が少ない理由として、歯根に限局する疾患を持つモデル動物が少ないことが上げられる。歯冠と歯根の両方に異常が現れる動物では、その異常が歯根に対する遺伝的影響のためなのか、歯冠に現れた形態異常の影響によるものなのかの判別が難しく、歯根の形態異常に対するモデル動物とはなり得ない。歯根にのみ現れる形態異常 (槌状根) を有するモデル動物として、C57L/J 系統および C57BR/CDJ 系統の近交系マウスが存在する。2006 年に有田らは μ -CT を用いて歯根の癒合の程度を量的形質として捉える新しい方法を開発した (Arita K, saito I, Arai Y: Evaluation of mouse gutter shaped root(s) as a quantitative trait using micro-CT. *Ped Dent J*:2006:16(1):23-27)。申請者らはこの研究をもとに、槌状根を有する C57L/J マウスと、正常歯根を有する AKR/J マウスとから作出された recombinant inbred マウスである AKXL RI 系統のマウスを使用し、量的遺伝解析を用いた研究によって、槌状根成因に関与する主働遺伝子が Chromosome 5 の特定領域に存在していることを報告し (Tashima I, arita K, Asada Y: Genetic study of gutter-shaped root (GSR) in AKXL RI mouse strains using QTL analysis. *J Oral Sci*:2010:52(2):213-220)、また、この報告の直前に有田らは C57L/J mice と AKR/J mice とから作出した N2 backcross mice を使用し、量的遺伝解析を用いた研究から Chromosomes 6, 7, 8 にも槌状根成因に関与する主働遺伝子が存在する候補領域があることを報告した (Arita K, Tashima I, Ikeda K, Nishimura H, Arai Y, Saito I, Asada

Y: Quantitative trait locus analysis of gutter-shaped root(s) in C57L/J mouse. *Ped Dent J*:2010:20(1):65-70)。そこで申請者は、上記の研究結果を踏まえ、候補領域に存在する遺伝子から硬組織、特に歯の形態形成との関わりが報告されている遺伝子を抽出し、それらの遺伝子のいずれかが、歯根の形態を決定する主働遺伝子として特定できるかを検討するために本課題を提出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯根の形態形成に関与する遺伝子の存在が示唆されている候補領域に存在する遺伝子群より選出した *SHH* signaling pathway に属する遺伝子である、*SHH* と *Gri1* を標的に免疫染色をおこない、槌状根成因に対する *SHH* signaling pathway の関わりを明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験を行うに当たり、鶴見大学歯学部動物実験委員会の承認を得た (No. 11081)。実験には槌状根を有する C57L/J 系統のマウス (以下 LJ マウス) と、正常歯根を有する C57BL/6J 系統のマウス (以下 B6 マウス) を使用した。すべてのマウスは室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、照明 12L/12D の環境で飼育し、給餌は pellet diet (Nihon Nohsan Company, Yokohama, Japan) を、飲水は水道水をそれぞれ自由摂取させた。

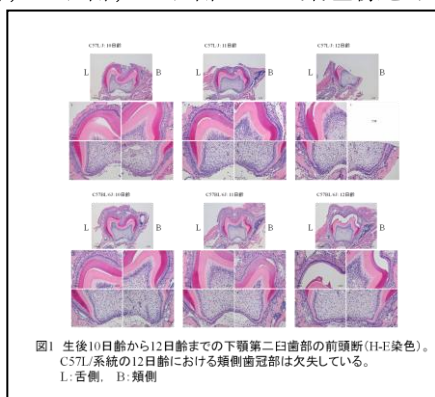
生後 10, 11, 12 日齢のマウスを安楽死させ、下顎第二臼歯を下顎骨ごと摘出した。摘出した下顎骨はただちに組織固定液中 (Genostaff) に浸漬した。そして以下の手順に従い、免疫染色を行った。

- 1) 組織固定液で室温にて 2 日間浸漬固定した。
- 2) 10%_EDTA 入りリン酸バッファーで 4°C にて脱灰処理した。
- 3) パラフィン包埋したのち、約 $4 \mu\text{m}$ の厚さで薄切した。薄切方向は前額断とし、歯根分岐部を染色に用いた。
- 4) パラフィン切片は、キシレンとエタノール系列を通して脱パラフィンした。
- 5) 4%_パラフォルムアルデヒド溶液中で室温にて 15 分間処理したのち、PBS ですすいだ。
- 6) $15 \mu\text{g/mL}$ _ProteinaseK (Takara) 溶液中で 37°C にて 30 分間処理したのち、PBS ですすいだ。
- 7) 4%_パラフォルムアルデヒド溶液中で室温にて 15 分間処理したのち、PBS ですすいだ。
- 8) 0.2N_HCl 溶液中で室温にて 10 分間処理したのち、PBS ですすいだ。

- 9) 0.1M tri-ethanoleamine-HCl (pH8.0) , 0.25% Acetic anhydride 溶液中室温にて10分間処理したのち、PBS すすいだ。
- 10) エタノール系列を通して切片を脱水した。
- 11) プローブ希釈液 (Genostaff) で 300ng/mL に調製したプローブを切片にアプライし、60°Cにて16時間ハイブリさせた。
- 12) 切片は、5x ハイブリ洗浄液 (Genostaff) で60°Cにて20分間処理した。
- 13) 50%フォルムアミド入り 2x ハイブリ洗浄液 (Genostaff) で60°Cにて20分間処理した。
- 14) 50 μg/mL RNaseA (Sigma) 溶液で37°Cにて30分間処理した。
- 15) 2x ハイブリ洗浄液 (Genostaff) で60°Cにて20分間処理した。
- 16) 0.2x ハイブリ洗浄液 (Genostaff) で60°Cにて20分間処理したのち、TBST すすいだ。
- 17) 切片は、0.5% Blocking Reagent (Roche) で室温にて30分間処理した。
- 18) Blocking Reagent を含む TBST で1000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体 (Roche) で室温にて2時間処理した。
- 19) TBST で2回すすいだのち、発色用バッファ (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween20, 100mM Tris-HCl, pH9.5) すすいだ。
- 20) NBT/BCIP 溶液 (Sigma) を切片にアプライし、十分な発色が得られるまで冷暗所にてインキュベートした。
- 21) PBS すすいだのち、ケルンエヒトロー溶液 (武藤化学) で対比染色した。
- 22) 水溶性封入剤の CC/Mount (Diagnostic Biosystem) でスライドを封入した。

4. 研究成果

図1にLJマウスとB6マウスのそれぞれ10日齢、11日齢、12日齢のH-E染色像を示す。

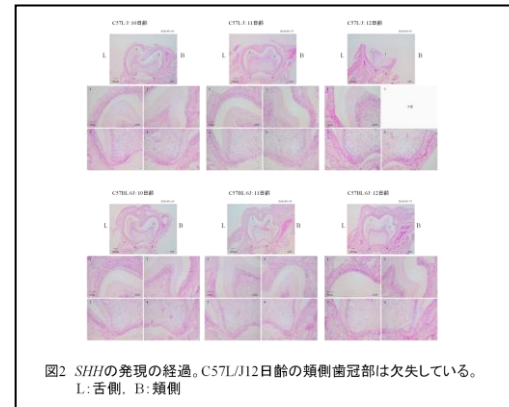


Control である B6 マウスは、10日齢から11日齢にかけて舌側、頬側から象牙質が内方へ伸長し、分岐部を形成している。これに比べ、mutant である LJ マウスにおいては、11日齢において頬側からは象牙質が伸長しているが、舌側からの象牙質の伸長は認められ

ず、12日齢においても分岐部の形成がなされてい

(1) SHH の発現

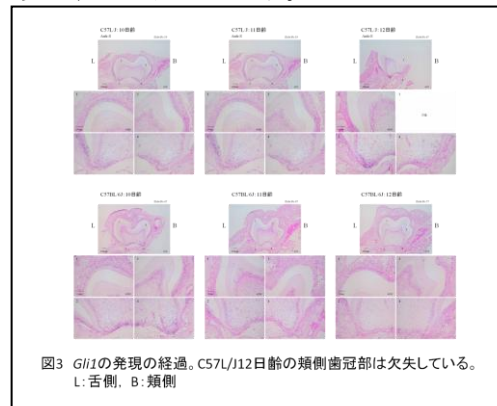
生後10日齢から12日齢までの SHH の発現の経過を図2に示す。



B6 マウスの歯根分岐部において、SHH の発現は、10日齢において発現がほとんど認められず、11日齢以降においても発現は認められなかった。これに対し LJ マウスの歯根分岐部においては、10日齢の歯根分岐部相当部に向けて SHH の微弱発現を認めたが、11日齢と12日齢においては発現が認められなかった。また、LJ マウス10日齢の歯根分岐部における SHH の発現は、頬側と舌側に差は認められなかった。

(2) Gli1 の発現

生後10日齢から12日齢までの Gli1 の発現の経過を図3に示す。



B6 マウスの歯根分岐部における Gli1 の発現は、10日齢の形成前の歯根分岐部相当部において明確な発現を認めたが、11日齢以降発現が認められなかった。これに対し LJ マウスにおいては、10日齢の歯根分岐部相当部に向けて SHH の明確な発現を認めた。その後、11日齢においては発現が弱まったが、12日齢においては舌側の Hertwig の上皮鞘の周囲で明確な発現な発現を認めた。

SHH signaling pathway は歯根の成長に重要な役割を持つことは過去の報告より明らかである (Khan M, Seppala M, Zoupa M, Cobourne MT. Hedgehog pathway gene expression during early development of the molar tooth root in the mouse. *Gene Expr Patterns*. 2007. 7(3):239-43.), (Nakatomi M, Morita I, Eto K, Ota MS. Sonic hedgehog signaling is important in tooth root development. *J Dent Res*. 2006. 85(5):427-31.). 今回の実験において、歯根分岐部における *SHH* の発現は、B6 マウスにおいては認められなかったが、LJ マウスの 10 日齢においては発現が認められた。すなわち、control である B6 マウスに比べ、mutant である LJ マウスの *SHH* の発現の消失は遅延することが示唆された。さらに *SHH* の下流に位置する *Gli1* においては、B6 マウスでは 11 日齢以降、発現が消失するのに対し、LJ マウスにおいては、11 日齢の *Gli1* の発現は減弱するものの発現は継続し、12 日齢以降においては分岐部の形成されない舌側で明確な発現が認められた。すなわち LJ マウスにおいては、本来消失するべき *Gli1* の発現が、舌側で消失しないために、分岐部の形成に異常が生じていることが示唆された。これらの結果は *SHH* signaling pathway が歯根の成長だけでなく、形態の決定にも重要な役割を演じていることを示唆している。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 格 (Tashima Itaru)
鶴見大学・歯学部・臨床助手
研究者番号：10612004

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし