

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463162

研究課題名(和文) 離乳期口腔における摂食機能の発達にかかわる分子の組織学的解析

研究課題名(英文) The molecular histological research of oral feeding development

研究代表者

大島 昇平(Oshima, Shohei)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：00374546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 歯の生える時期にカルシニューリンという遺伝子の発現に関わる分子が歯の生える部位の歯肉と歯胚(顎の骨に埋まっている歯)の周囲に発現している事がマウスにおいて確認できた。カルシニューリンが歯の生える事に関わっている可能性が考えられた。

仔マウスに吸啜(母乳を飲む)させるとc-fosという脳の神経の活動の指標となる分子が三叉神経主知覚核(顔や口の触覚に関与している)と運動核周囲の網様体に発現していた。聴覚に関連する部位にも、吸啜運動とは関係ないが、c-fosの発現がみられた。上口唇の知覚神経を切断し、吸啜させたが、c-fosの発現には変化がみられなかった。

研究成果の概要(英文)： Calcineurin was expressed in the enamel organ, the dental follicle and the gingival epithelium of mouse during tooth formation. Until Just before tooth eruption, the expression of calcineurin was confirmed in the enamel organ, the dental follicle and the gingival epithelium. Calcineurin expression appear to correlate with tooth eruption.

In the suckling mouse during postnatal development, immunoreactivity of c-fos was detected in the reticular formation near the trigeminal motor nucleus and the principal sensory nucleus of trigeminal nerve. C-fos was also detected in the lateral lemniscus and the inferior colliculus regardless of suckling. After transection of the infraorbital nerve, the expression pattern of the brainstem after suckling did not change.

研究分野：小児・障害者歯科学

キーワード：calcineurin tooth eruption suckling

1. 研究開始当初の背景

離乳期には歯の萌出や咀嚼の獲得など、口腔内には大きな変化がみられる。歯の形成、萌出に関わる分子機構や離乳期の摂食機能の神経制御機構については、国内外で研究が進められているが、まだ不明な点が多い。以前報告者は転写活性制御因子である、カルシニューリンがマウスの歯の形成に参与している可能性を報告しており、カルシニューリンが歯の萌出にも関わっている可能性があると考えている。また、咀嚼・吸啜時のマウスの脳幹には神経活動のマーカとなる c-fos が発現することが知られており、摂食機能にかかわる脳幹領域の報告も行われている。カルシニューリン、c-fos の解析を行う事によって、離乳期口腔内に起きる変化について新しい知見が得られると考える。

2. 研究の目的

本研究は(1)カルシニューリンが歯の萌出に関わる役割を解明すること、(2)吸啜時マウス脳幹にて c-fos の発現解析を行い、離乳期の摂食機能の神経制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は主に免疫組織化学法を用いた。

(1) 歯の萌出時の歯胚領域におけるカルシニューリンの発現解析

歯胚の形成中から歯胚の萌出直前くらいと思われる生後7日(P7)から生後14日(P14)までの臼歯部歯胚を含むマウス顎骨領域の脱灰パラフィン切片を作成した。得られた切片にたいして、抗カルシニューリン抗体を用いて免疫組織化学法を行い、カルシニューリンの発現を解析した。抗カルシニューリン抗体は本学医学研究科解剖発生学渡辺雅彦教授のご厚意により、供与を受けた。なお、以前歯胚での発現を確認した、CNAalpha、CNAbeta、CNB1 サブユニットについて解析を行った。

(2) 吸啜時マウス脳幹における c-fos の発現解析

吸啜期から離乳の開始直前と思われる P4 から P12 までの仔マウスを対象とした。前日の夜から母子分離を行い、当日朝に母マウスに戻して授乳させた2時間後に、仔マウスを安楽死させ、脳幹の凍結切片を作成した。得られた切片に対して、抗 c-fos 抗体を用いて免疫組織化学法を行い、c-fos の発現を解析した。また、生後2日目に右眼窩下神経を切断し、吸啜させた群と、安楽死させる2日前に右眼窩下神経を切断し、吸啜させた群についても解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス臼歯の萌出期におけるカルシニューリンの発現

歯冠部の形成がほぼ終了した P10 では

CNAalpha の発現はエナメル器の外エナメル上皮と星状網中間層が融合した乳頭層にみられた。歯小囊、歯胚に近接する歯肉にも発現がみられた(図1)。

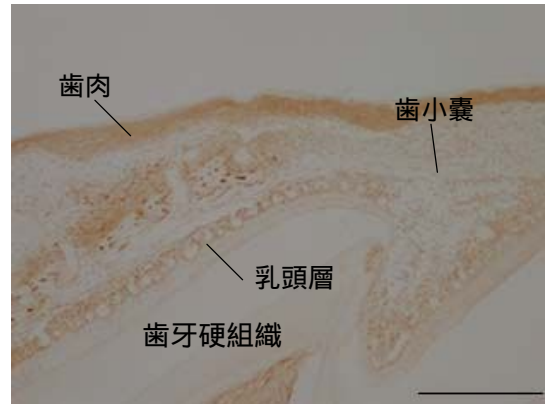


図1 P10マウス臼歯部におけるCNAalphaの発現。スケールバーは200μm。

CNAbeta は歯小囊、歯胚に近接する歯肉にも発現がみられた(図2)。

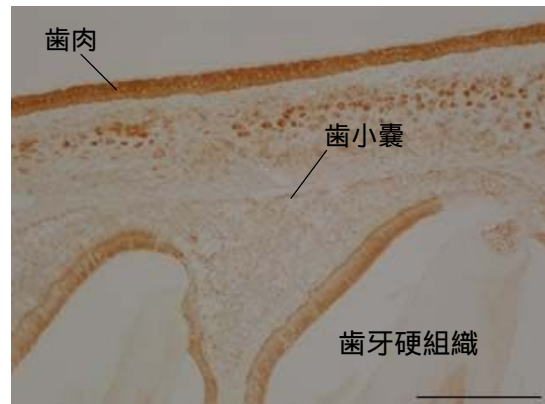


図2 P10マウス臼歯部におけるCNAbetaの発現。スケールバーは200μm。

CNB1 は乳頭層、歯小囊、歯胚に近接する歯肉にも発現がみられた(図3)。

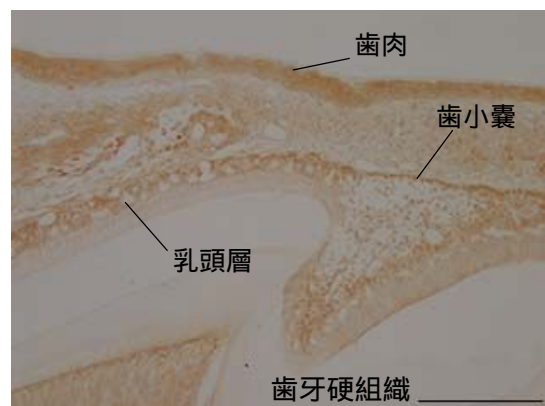


図3 P10マウス臼歯部におけるCNB1の発現。スケールバーは200μm。

臼歯が間もなく萌出する P14 では歯胚に近接する歯肉と退縮エナメル上皮に CNAalpha、CNAbeta、CNB1 の発現が、歯小囊に CNAalpha、CNB1 の発現がみられた(図4、5、6)。

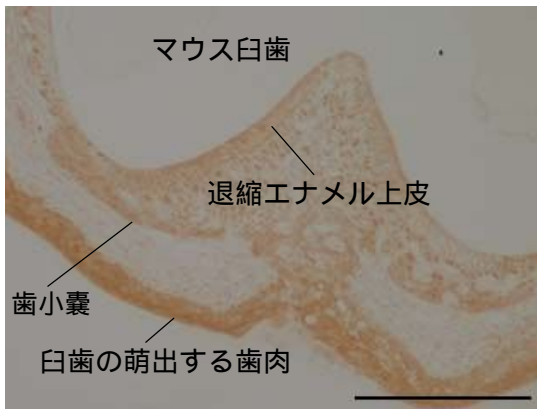


図4 P14 マウス臼歯部におけるCNAalphaの発現。



図5 P14 マウス臼歯部におけるCNAbetaの発現。スケールバーは200 μm。

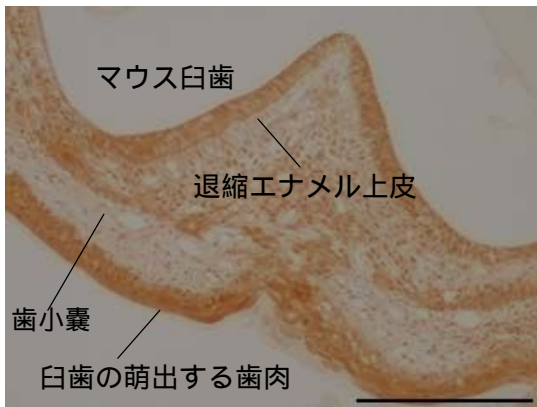


図6 P14 マウス臼歯部におけるCNB1の発現。スケールバーは200 μm

歯の萌出時期の歯胚の周囲組織、歯肉にはカルシニューリンが発現していた。触媒サブユニットのCANサブユニットと修飾サブユニットである、CNBサブユニット共に発現しており、なんらかの役割を果たしていることが考えられた。とくに萌出直前の歯肉と歯小囊には強い発現がみられた。この部位のどの細胞にカルシニューリンが発現しているかは今後の検討課題となるが、歯の萌出にカルシニューリンが関わっている可能性は高いと思われた。

(2)吸啜時マウス脳幹におけるc-fosの発現
これまでの報告にあったように、吸啜時マウスの延髄の三叉神経脊髄路核や毛様体にc-fosの発現が確認できた。P4のマウスでは

確認できなかったが、P8、P12のマウスでは吸啜時に三叉神経運動核の周囲の毛様体と三叉神経主知覚核にc-fosが発現していた(図7)。

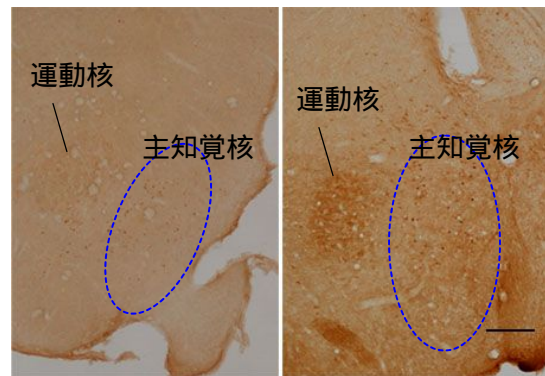


図7 吸啜時マウスのc-fosの発現。左図はP8、P12。スケールバーは200 μm。

三叉神経核のうち中脳路核にはP4、P8、P12いずれにも吸啜時のc-fosの発現はみられなかった。また、吸啜には関係なく、P8のマウスには、聴覚系の伝導路である、外側毛帯と下丘に発現がみられた(図8)。

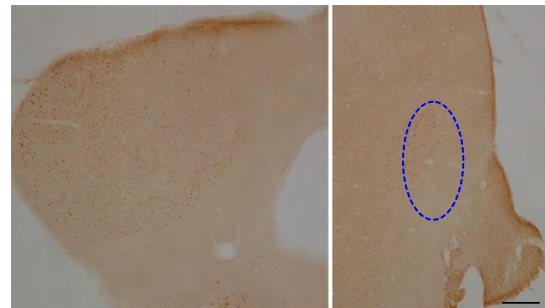


図8 P8のマウスの下丘(左図)、外側毛帯(右図)でのc-fosの発現。スケールバーは200 μm。

右眼窩下神経を切断したマウスの吸啜時のc-fosの発現については、切断側と非切断側で特に変化がみられなかった。マウスの三叉神経脊髄路核、主知覚核は吸啜時にc-fosが発現するので、吸啜運動に関わる神経制御機構に関与していると思われるが、今回の解析では片側の眼窩下神経を切断しても脳幹部の吸啜運動に関わる神経制御機構には変化がおきなかった。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

Oshima Shohei, Yasutaka Yawaka, Upregulated expression of class III beta-tubulin at the mineralization stage of developing mouse molar teeth, 28 May 2015, 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 東京ドームホテル(東京都文京

区)

大島 昇平、八若 保孝、喉頭気管分離
術後の患児の口腔内より排出された異物
について、平成 25 年 5 月 23 日、第 51
回日本小児歯科学会、長良川国際会議場
(岐阜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 昇平 (OSHIMA Shohei)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号： 00374546

(2) 研究分担者

菊入 崇 (KIKUIRI Takashi)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号： 10322819

高崎 千尋 (TAKASAKI Chihiro)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号： 60451449