

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463199

研究課題名(和文) マウス先天欠如歯の遺伝要因解明

研究課題名(英文) Genetic analysis of tooth agenesis in mice

## 研究代表者

清水 武彦 (SHIMIZU, Takehiko)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：40328761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、100%の頻度で第三臼歯(M3)を欠如しているELマウスを用い、先天欠如歯発症の遺伝要因を解明し、ヒトの先天欠如歯の原因解明の足掛かりとすることであった。ELと対照マウスの蕾状期歯胚において遺伝子発現の差を検討した。ELのM3歯胚においてLef1, Fgf20, Fgf4のmRNAの著名な発現低下を認めた。従って、ELマウスのM3歯胚におけるLef1, Fgf20, Fgf4のmRNA発現の減少が、M3の先天欠如に關与する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify the genetic causes of the lacking M3s in EL mice, which have 100% incidence of M3 agenesis. M3 tooth germs from EL and control mice on postnatal day 3 were dissected out and total RNA was extracted. mRNA expressional analysis was carried out using DNA microarray, real-time polymerase chain reaction and in-situ hybridization. Results: DNA microarray analysis revealed significantly decreased expression of Lef1, Fgf20 and Fgf4 in the M3s of EL mice at the bud stage relative to control mice, which was supported with both reverse-transcriptase polymerase chain reaction and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses. Furthermore, in-situ hybridization revealed low mRNA expression levels of Fgf20 and Fgf4 in the M3s of EL mice, whereas strong signals were observed in control mice. Our results suggest that a decrease of Lef1, Fgf20 and Fgf4 expression may lead to M3 agenesis in EL mice.

研究分野：小児歯科学

キーワード：先天欠如歯 歯の発生 遺伝子 遺伝子発現 歯胚 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

歯の先天欠如は歯列咬合の異常を引き起こし、また審美的な問題も生じることから先天欠如歯の原因を解明することは歯科臨床上也大変意義深い。歯の先天欠如の原因となる遺伝子変異は *MSX1*、*PAX9*、*AXIN2* および *EDA* において報告されているが、これらは全て第一大臼歯欠如も含めた多数歯欠損の原因であり、日常歯科臨床で頻繁に遭遇する第三大臼歯の先天欠如や前歯・小臼歯の少数歯先天欠損の原因は未知である。ヒトを用いた研究がその原因を解明しようと試みているが成功していない。従って、先天欠如歯発症の原因を解明するためには、まずモデル動物を用いてその原因を解明し、その後ヒトの欠如歯に応用するという方法が近道となる。歯の先天欠如のための有用なモデルマウスとして Epilepsy-like disorder (EL) マウスがあり、EL マウスは 100% の頻度で最後臼歯である第三臼歯を欠如しており、ヒトの第三大臼歯欠損の有用なモデル動物である。申請者らは EL マウスの第三臼歯欠如の遺伝的要因が第 3 番染色体の 125-137 メガベースペア (Mbp) にあることを *in vivo* で証明し、当該領域内には *Lef1*、*Hadh*、*Cyp2u1*、*Sgms2*、*Papss1* 遺伝子が存在するためこれらの遺伝子が EL マウスの第三臼歯欠如の候補であることを明らかにした<sup>1)</sup>。特に *Lef1* は歯の初期発生に必須の転写因子であり、*Lef1* が EL マウスの最後臼歯欠如の候補遺伝子の一つである。

## 2. 研究の目的

EL マウスは、頭蓋顔面の外表奇形なしに 100% の頻度で第三臼歯 (M3) が欠如している。マウスはヒトとの遺伝的相補性の高く、ヒトの歯の先天欠如の原因究明に応用できる良いモデルである。そこで、EL マウスを用いて M3 欠如の責任遺伝子を探索し、ヒトの歯の先天欠如の原因解明の足がかりにすることを目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) EL マウス第三臼歯歯胚の組織学的検討

EL マウスとコントロールマウスの M3 欠如頻度の再評価および組織学的検討を行った。頭部の切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、生後 3、4、5 日齢の M3 歯胚を実体顕微鏡下にて観察した。

### (2) EL マウス第三臼歯歯胚における遺伝子発現の網羅的解析

EL マウスの第三臼歯歯胚の発達は蕾状期で停止し帽状期に進行しない。そのため、歯胚の遺伝子の発現解析では、蕾状期から帽状期へと移行する生後 3-4 日の第三臼歯歯胚を EL マウスと、野生型マウスより採取し、トータル RNA を抽出した。方法として、マウスを安楽死させた後、直ちに凍結切片を作製し、実体顕微鏡下にてマイクロダイセクション法により第三臼歯歯胚を回収した。周囲組

織を排除して歯胚のみを採取し RNeasy Total RNA kit (Qiagen) を用いてトータル RNA を回収した。抽出したトータル RNA を用いて、DNA マイクロアレイ解析にて網羅的遺伝子発現解析を行った。Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を用い、マイクロアレイは SurePrint G3 Mouse GE 8 × 60 K Microarray (Agilent Technologies) を用いた。データ解析は GeneSpringGX13 software (Agilent Technologies) を用いた。DNA マイクロアレイ解析の結果から NCBI データベース上で歯の発生に関連した遺伝子を選定した。

### (3) RT-PCR 解析およびリアルタイム PCR 解析

EL マウスの先天欠如歯発症の原因遺伝子が *Lef1*、*Hadh*、*Cyp2u1*、*Sgms2*、*Papss1* 遺伝子である可能性を申請者は過去に報告している。したがって、これらの遺伝子をターゲットとし、RT-PCR 解析およびリアルタイム PCR 解析を行った。RT-PCR は PrimeScript High Fidelity RT-PCR kit (Takara) を用い、GAPDH を内在性コントロールとした。リアルタイム PCR 解析は Thermo Scientific DyNAmo SYBR Green qPCR kits (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

また、DNA マイクロアレイ解析から、*Fgf20* と *Fgf4* に興味のある結果が得られた。更に、過去の文献より *Eda* は歯の形成初期に *Fgf20* と *Fgf4* の発現を調節していると報告されているため、*Fgf20*、*Fgf4*、*Eda* のプライマーを設計し、同様に RT-PCR およびリアルタイム PCR 解析を行った。

### (4) *In Situ* ハイブリダイゼーション解析

*In Situ* ハイブリダイゼーション法により *Fgf20* と *Fgf4* の特異的プローブを用いて、M3 歯胚における mRNA の局在および発現量を検討した。*In Situ* ハイブリダイゼーションは Genostaff protocol (Tokyo) に従って行った。

### (5) 遺伝子変異解析

*Lef1*、*Fgf20*、*Fgf4*、*Eda* のエクソン内に変異があるかどうかを分析するために、これらの遺伝子のそれぞれのエクソンを特異的に PCR 増幅するプライマーを設定した。これらエクソン領域を BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit V3.1 (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンス法にて DNA 配列を決定し、Ensembl データベースの DNA 配列と比較した。

## 4. 研究成果

### (1) EL マウス第三臼歯歯胚の組織学的検討

M3 欠如頻度は EL マウスでは上下顎左右側とも 100% 欠如していたが、コントロールマウスでは欠如は観察されなかった。生後 3、4、5 日齢の M3 の HE 染色切片観察の結果、EL マウスの M3 歯胚は蕾状期で停止していた。一

方、コントロールマウスの歯胚は蓄状期を経て帽状期まで発達していた(図1)。

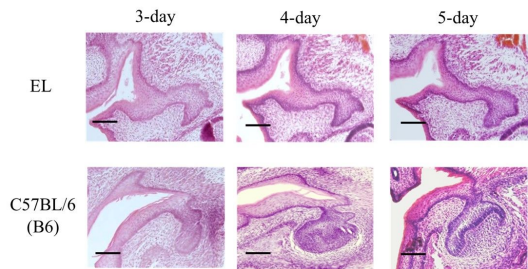


図1 ELのM3歯胚発達の停止(bar:100μm)

(2) ELマウス第三臼歯歯胚における遺伝子発現の網羅的解析

DNAマイクロアレイ解析の結果、ELマウスの蓄状期M3歯胚における発現比率は*Fgf20*は8.06倍、*Fgf4*は4.86倍、*Lef1*では2.25倍減少していた。*Eda*では増加していた(log<sub>2</sub>比率:0.29)。

ヒトの部分性無歯症関連の遺伝子(*Msx1*、*Pax9*、*Axin2*、*Spry2*、*Spry4*、*Wnt10a*)では2倍以上の差はみられなかった。

(3) RT-PCR解析およびリアルタイムPCR解析

ELのM3歯胚での*Lef1*のmRNA発現量がコントロールマウスと比較し有意に低かった。*Hadh*、*Cyp2u1*、*Sgms2*、*Papss1*ではELとコントロールに発現量に有意差は認められなかった(図2)。

また、ELマウスのM3歯胚の*Fgf20*と*Fgf4*のmRNA発現低下、*Eda*の発現増加について統計的に有意差が認められた(図3)。

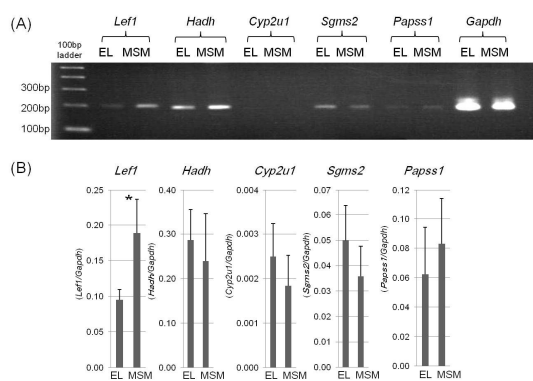


図2 *Lef*、*Hadh*、*Cyp2u1*、*Sgms2*、*Papss1*のM3歯胚におけるRT-PCRおよびリアルタイムPCR解析

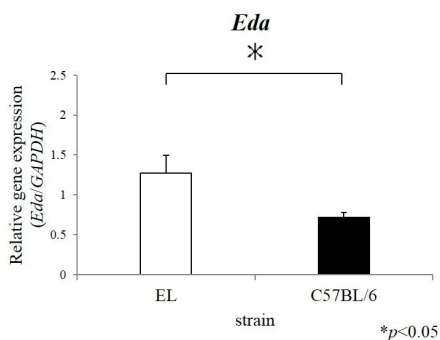
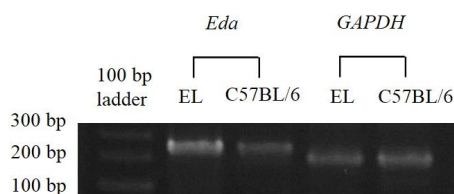
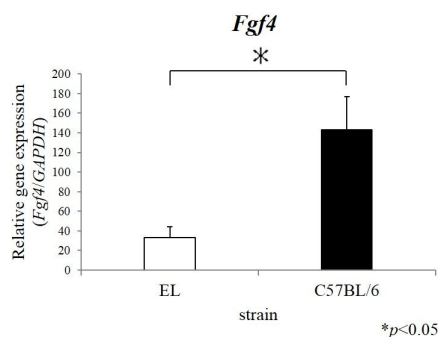
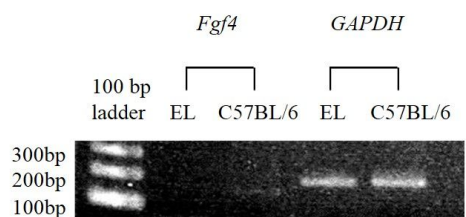
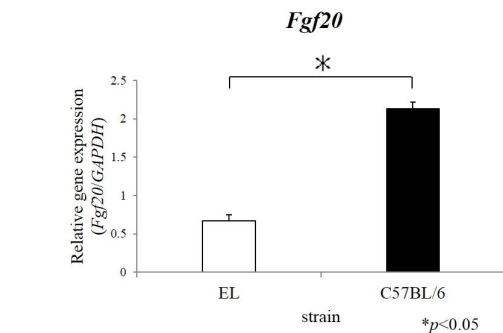
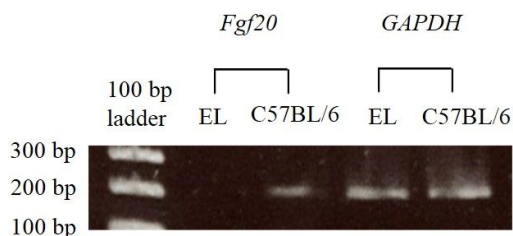


図3 *Fgf20*、*Fgf4*、*Eda*のM3歯胚におけるRT-PCRおよびリアルタイムPCR解析

(4) *In Situ*ハイブリダイゼーション解析  
*Fgf20*と*Fgf4*のmRNA発現はコントロールマウスの蓄状期のM3歯胚上皮先端部で強く観察された。一方、ELマウスの蓄状期M3歯胚ではほとんど観察されなかった。またHE

染色にて、C57BL/6 マウスの *Fgf20* と *Fgf4* の mRNA の強発現が観察された歯胚上皮先端において細胞集積によるエナメルノットが観察された。一方、EL マウスでは観察できなかった (図 4)。

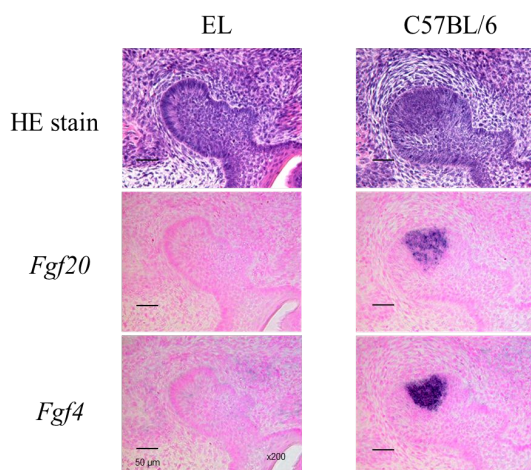


図 4 *Fgf20* および *Fgf4* の M3 歯胚における *In Situ*ハイブリダイゼーション解析

#### (5) 遺伝子変異解析

遺伝子変異解析では、EL マウスの *Fgf4* のエクソン 2 において、アミノ酸配列に変化のない 1 つのサイレント変異を検出した。また EL マウスの *Fgf20* のエクソン 1 において、アミノ酸配列が置換する 1 つの非同義変異を検出したが、データベース上に既に多型として同定されていた。一方、*Lef1* および *Eda* のエクソンでは変異は認められなかった。

以上のことから、EL マウスを用いて M3 欠如の責任遺伝子を解明することを目的に検討を行った結果、EL マウスの蓄状期 M3 歯胚における *Lef1*、*Fgf20* と *Fgf4* の mRNA 発現の減少が EL マウスの M3 の先天欠如に関与する可能性を示唆した。また EL の M3 での *Eda* の mRNA 発現上昇は、M3 発生に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。従って、今後ヒトの先天欠如歯の原因を探求するにあたり、*Lef1*、*Fgf20*、*Fgf4* が分析対象となる可能性が示唆された。

#### <引用文献>

1) 森田 渉、清水 武彦、前田 隆秀：マウス欠如歯原因遺伝子の染色体マッピング、小児歯誌、46 巻、2008、511-516

#### 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)

Takehiko Shimizu, Eri Yokoi, Takahiro Ichinosawa, Yuri Kiguchi, Fusae Ishida, Takahide Maeda. *Lef1* may contribute to agenesis of the third molars in mice, *Open Journal of Stomatology*, 査読有,

3(5), 2013, 281-286.

DOI: 10.4236/ojst.2013.35047

#### [学会発表](計 2 件)

Nao Ogawa, Wataru Morita, Takehiko Shimizu. Comprehensive expression analysis of the gene in connection with mouse lack tooth development, 25<sup>th</sup> Congress of the International Association of Paediatric Dentistry, 2015年7月4日, グラスゴー, イギリス. 小川 奈保、森田 渉、平木 晶子、清水 武彦、前田 隆秀、マウス欠如歯発症に関わる遺伝子の網羅的発現解析、第 52 回日本小児歯科学会、2014 年 5 月 17 日、きゅりあん、東京都、品川区。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

清水 武彦 (SHIMIZU, Takehiko)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：40328761

##### (2) 研究分担者

なし