

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870666

研究課題名(和文) 歯根の形態を制御する主働遺伝子の特定と臨床応用の可能性

研究課題名(英文) Identification of genes that play an important role in tooth root morphogenesis

研究代表者

田島 格(TASHIMA, Itaru)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：10612004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯根の形態形成に影響を与える遺伝子の特定を目的に、槌状根を有するC57L/J系統のマウスと、正常根を有するC57BL/6J系統のマウスを用いて、10, 11, 12の各日齢でin situ hybridizationを行った。標的遺伝子はSHH signaling pathwayに属する遺伝子であるSHH, Ptc1, SMO, Gli1である。両系統のマウスの間には、歯根分岐部でSMO以外の遺伝子には発現パターンに差が認められた。このことから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。しかしSMOの発現に差は認められずその理由は不明である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify the genes for influencing to tooth root form using C57L/J strain mice(LJ mice) and C57BL/6J strain mice(B6 mice). We performed in situ hybridization to analyze the expression patterns of gene belong to sonic hedgehog(SHH) signaling pathway in postnatal days 10, 11, 12 of mice. Expression patterns of SHH, Ptc1 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.

研究分野：小児歯科

キーワード：遺伝子 マウス 槌状根 in situ hybridization

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 (抄録): 日本口腔外科学会誌: 2010;56(1):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事理由として、歯根に局限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。この C57L/J 系統のマウスを用いて有田らは、2006 年に 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)。研究代表者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)。さらに研究代表者は、槌状根を有する C57L/J 系統のマウスと正常歯根を持つ C57BL/6J 系統のマウスを用いた遺伝子発現解析を経時的に行い、Sonic hedgehog Signaling Pathway (SHH Signaling Pathway) が大きく関与していることを見出している。そのうえで研究代表者は、SHH Signaling Pathway のリガンドである Sonic hedgehog (SHH) と膜受容体を介し核内に蓄積され、Pathway の標的遺伝子への転写を制御する GLI-Kruppel family member 1 (Gli1) を対象に、免疫組織化学染色 (immunohistochemistry (IHC)) を行い、歯根分岐部におけるタンパク質の発現の観察を経時的に行った。その結果、歯根分岐部形成期においてタンパク質発現に明らかな差が認められることを確認した。そこで研究代表者は、上記の研究結果を踏まえ、槌状根の形態形成期に SHH signaling pathway に属する遺伝子がどのような発現をしているのかを解明することを目的として上記課題を提出した。

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 に属する主要な遺伝子である *SHH* , *Ptc1* , *SMO* , *Gri1* を標的に in situ hybridization を行い、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 ± 2 , 湿度 $55 \pm 5\%$, 照明 12 L / 12 D 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 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 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 溶液中で室温にて 10 分間処理したのち、PBS ですすいだ。

(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 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 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 にて 20 分間処理した。

(14) 50 $\mu\text{g/mL}$ _RNaseA (Sigma) 溶液で 37 にて 30 分間処理した。

(15) 2x ハイブリ洗浄液 (Genostaff) で 60 にて 20 分間処理した。

(16) 0.2x ハイブリ洗浄液 (Genostaff) で 60 にて 20 分間処理したのち、TBST ですすいだ。

(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、発色用バッファー (100mM NaCl, 50mM MgCl_2 , 0.1% Tween20, 100mM Tris-HCl, pH9.5) ですすいだ。

(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

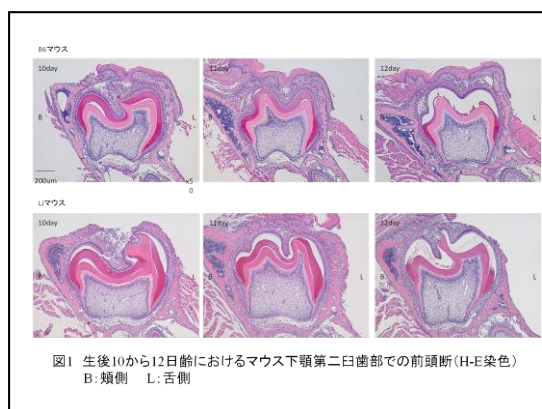
にてインキュベートした。

(21) PBS ですすいだのち、ケルンエヒトロート溶液（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

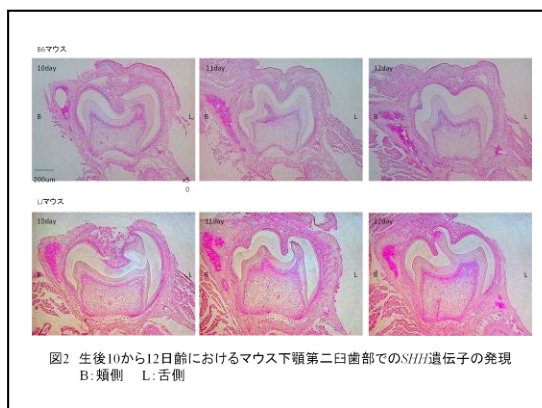
図1にLJマウスとB6マウスのそれぞれ10日齢,11日齢,12日齢のH-E染色像を示す。



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日齢において舌側からは象牙質が伸長しているが,頬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ない。

(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。

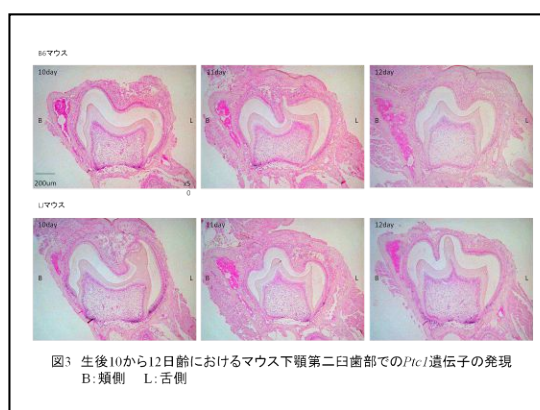


B6マウスの歯根分岐部において,*SHH*の

発現は,10,11,12日齢のいずれ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では,10日齢の歯根分岐部相当部に向けて*SHH*の微弱な発現を認めた。しかしながら,11日齢と12日齢においては発現が認められなかった。

(2) *Ptc1* の発現

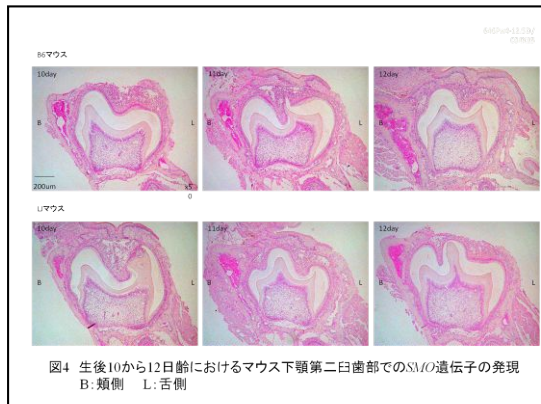
生後10日齢から12日齢までの*Ptc1*の発現の経過を図3に示す。



B6マウスの歯根分岐部において,*Ptc1*の発現は,10日齢に発現が認められた。その後,11日齢では発現が弱まり,12日齢では発現がほとんど見られなくなった。これに対しLJマウスの歯根分岐部では,10日齢の歯根分岐部相当部において*Ptc1*の発現を認め,11日齢と12日齢においても発現の継続が認められた。

(3) *SMO* の発現

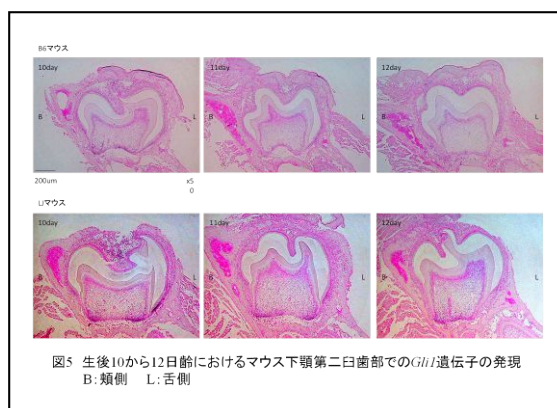
生後 10 日齢から 12 日齢までの *SMO* の発現の経過を図 4 に示す。



SMO の発現に局在は認められなかった。

(4) *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 5 に示す。



B6 マウスの歯根分岐部における *Gli1* の発現は、10 日齢において認められたが、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おいて *Gli1* の発現を認めた。その後、11 日齢、12 日齢においても発現は継続していた。

考察

今回の研究によって、マウス第二臼歯の歯根分岐部の形態形成期における、正常歯根を有する B6 マウスと槌状根を有する LJ マウスの間には、*SHH* signaling pathway に属する遺伝子の発現に差があることが示唆された。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。下流である *Ptc1*、*Gli1* の発現も B6 マウスでは 11 日齢以降、発現が減弱、消失することが示されたことに対し、LJ マウスでは *Ptc1*、*Gli1* の発現は 10、11、12 日齢のいずれでも発現していることが示された。すなわち LJ マウスにおいては、本来消失すべき根分岐部の *SHH* signaling pathway に属する遺伝子の発現が消失しないために、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はなく、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

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田島 格 (TSHIMA Itaru)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：10612004