

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11814

研究課題名(和文) 染色体置換マウスを用いた唾液分泌能の個体差と齲蝕感受性に関する遺伝因子の探索

研究課題名(英文) Investigation of the individual difference of ability to salivate and the genetic factor for susceptibility to dental caries using chromosome substituted mice strains

研究代表者

清水 邦彦 (SHIMIZU, Kunihiro)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：30328760

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)：齲蝕(むし歯)に影響する遺伝因子を調査するため、齲蝕感受性の高いマウスと感受性の低いマウスから樹立した染色体置換マウスを使用して、さらに染色体置換領域を狭めた3系統のコンソミックマウスを作製した。この3系統の齲蝕スコア、刺激時唾液分泌量、エナメル質硬度を解析した結果、本実験系での齲蝕抵抗性には唾液分泌量が強く関与し、この唾液分泌に関与する遺伝要因がマウス第2番染色体の84Mbpと163Mbpの間に存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、虫歯になりやすいマウスと、なりにくいマウスを利用し、これら実験用マウスの虫歯になりにくい体質の1つとして、唾液分泌量の関与を直接的に証明した。さらに唾液分泌量に影響する遺伝因子が、マウス第2番染色体の一定領域に存在することを明らかにした。この領域はヒト第15番染色体に相当する。今後、この領域に存在し、虫歯の感受性に関与する遺伝子が特定できれば、ヒトにおいて、新しい虫歯予防法の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：For investigate the genetic factors influenced to dental caries (tooth cavity) susceptibility, we established three congenic mice strain using consomic mice obtained with crossing inbred mice which property were high and low susceptibility of dental caries. From analytical results of the caries scores, the volume of stimulated saliva secretion and enamel hardness using 3 congenic strain mice, we suggested that salivary secretion volume was one of the most important factors associated with dental caries susceptibility in our experimental system, and the candidate genes for salivary secretion located between 84Mbp to 163Mbp on mice chromosome 2.

研究分野：小児歯科

キーワード：齲蝕感受性 遺伝因子 染色体置換マウス 唾液分泌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

齲蝕症は細菌、糖質、宿主及び時間の4要素で生じると考えられ、齲蝕予防にはこれらの要素にアプローチすることで行われている。日常的には糖質の制限、歯ブラシ、フッ化物の応用が行われており、開発中のものとして、齲蝕原因菌に対するワクチン、*S. mutans* 菌の産生する不溶性グルカンの分解酵素の開発が進められている。しかしながら、これまでに宿主に關与するアプローチがほとんど見られない。臨床の場合において、口腔衛生状態が不良でも全く齲蝕を発症しない場合もあり、宿主側に存在する要因が強く働いていることは明らかである。そこで宿主側に存在する因子を遺伝的側面から解明しようと、近交系マウスを用いた実験齲蝕モデルの確立を行った<sup>1)</sup>。このモデルを用い齲蝕原因菌に対する様々なマウス系統の感受性について検討を行ったところ、系統により齲蝕感受性が異なることが判明した。これらの系統のうち齲蝕感受性の高いC57BL/6(B6)マウスと、齲蝕抵抗性のC3Hマウスを用いた交配実験によりその遺伝形式の解析を行ったところ、齲蝕感受性に關与する宿主の遺伝子は単一の遺伝子ではなく複数の遺伝子が關与していることが明らかとなったため<sup>2)</sup>、これらマウスを利用し齲蝕感受性に關与する遺伝要因を探索するに至った。

### 2. 研究の目的

これまでに異なる齲蝕感受性を持つマウスを利用した量的形質遺伝(QTL)解析にてマウス第1、2、7、8番染色体に齲蝕感受性決定遺伝子が存在することが判明している。特にマウス第2番染色体に高確率で影響の強い齲蝕感受性決定遺伝子が存在する可能性が示されているため<sup>3)</sup>、齲蝕感受性マウスの染色体のうち、第2番染色体のみを齲蝕抵抗性マウスのものに置き換えたコンソミックマウス(B6-Chr.2<sup>C3H</sup>)を作成した(平成18年度科学研究費補助金若手研究(B)課題番号18791567)<sup>4)</sup>。本研究ではこのコンソミックマウスを利用して、マウス第2番染色体上の齲蝕感受性に影響する染色体領域を限定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

B6とB6-Chr.2<sup>C3H</sup>を計画的に交配し、ジェノタイプングを行い多重交差の有無を確認し、選択したマウスを再び交配した。最終的にマウス第2番染色体に導入されたC3H由来の領域がホモ型を示す雌雄のマウスを交配させ、コンジェニックマウスを確立した。作製したコンジェニックマウス、B6、C3HとB6-Chr.2<sup>C3H</sup>を対象に*S. mutans*による齲蝕誘発実験を行い、マイクロCT(Rigaku Japan)で齲蝕の罹患状態を観察、スコア化し評価した。刺激時唾液分泌量は、ピロカルピンを腹腔内注射直後から30分間、マウスの口腔内からピペットで唾液を採取し、総唾液量を測定した。エナメル質硬度はダイナミック超微小硬度計(shimadzu Japan)を用いて、下顎左側第一臼歯舌側のエナメル質の硬度を測定した。

### 4. 研究成果

本研究で、以下の結果を得た<sup>5)</sup>。

#### (1) コンジェニックマウスの作製

マウス第2番染色体の163Mega base pair (Mbp)と179Mbpの間( congenic 1)、84Mbpと163Mbpの間( congenic 2)、84Mbpと106Mbpの間( congenic 3)がC3H由来の領域を示すコンジェニックマウス3系統を作製した(図1)。

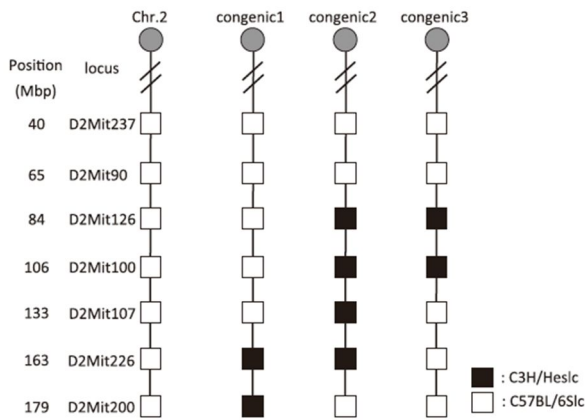


図 1：作製した congenic マウスの染色体分布図。

(2) *S. mutans* 感染による齲蝕誘発実験と Caries score の算定

齲蝕誘発実験では Caries score を算定し比較したところ、B6-Chr.2<sup>C3H</sup> とコンジェニックマウスの3系統間、congenic 2 と congenic 1、congenic 2 と congenic 3 の間に有意差を認めた。congenic 1 と congenic 3 の間に有意差は認めなかった (図 2、3)。

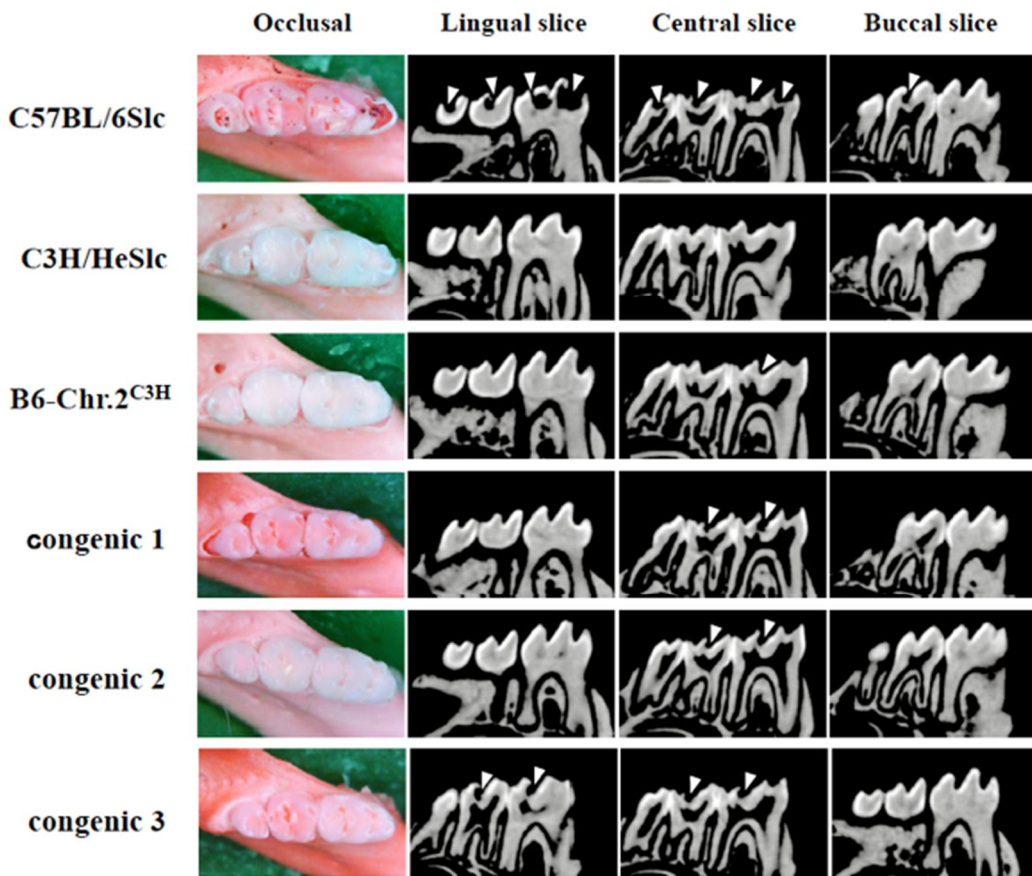


図 2：齲蝕誘発実験後の下顎臼歯部口腔写真および micro-CT 画像

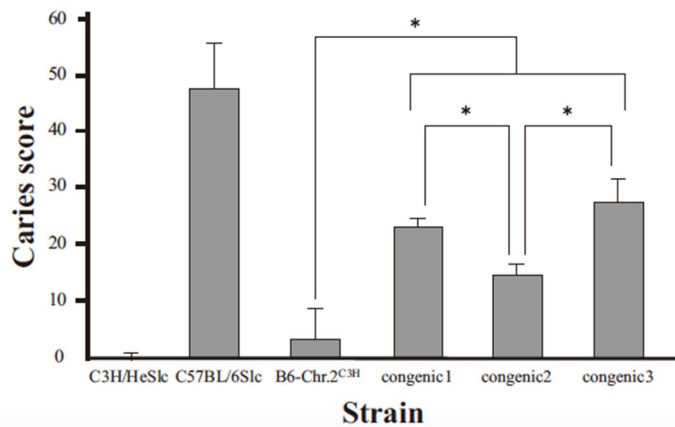


図3：micro-CT から算出した齲蝕スコアの各系統間の比較

(3) ピロカルピン刺激による唾液分泌量の測定

刺激時唾液分泌量は congenic 2 が多い傾向を認めたが、B6-Chr.2<sup>C3H</sup> とコンジェニックマウスの系統間、あるいはコンジェニック 3 系統間に有意差は認めなかった (図 4)。

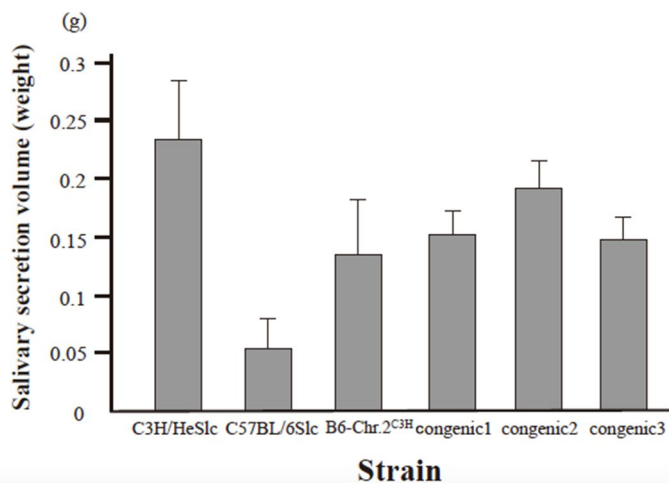


図4：各系統間における 30 分間の刺激唾液分泌量の比較

(4) エナメル質硬度の比較

エナメル質硬度は B6-Chr.2<sup>C3H</sup> とコンジェニックマウスの 3 系統間、またコンジェニック 3 系統間に有意差を認めなかった (図 5)。

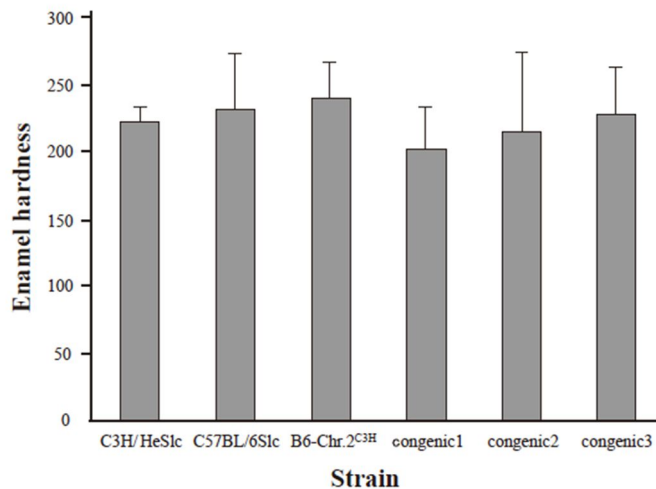


図5：各系統間における下顎第一臼歯舌側部のエナメル質硬度の比較

以上より、congenic 2の齲蝕スコアが他のコンジェニック系統と比較し有意に低いことから、齲蝕抵抗性遺伝子がマウス第2番染色体の84Mbpと163Mbpの間に存在する可能性が示唆された。また唾液分泌量は齲蝕に関連する重要な因子の一つであり、congenic 2の唾液分泌量がB6-Chr.2<sup>C3H</sup>と他のコンジェニック系統より多い傾向を示したことから、唾液分泌量に影響する遺伝子が84Mbpと163Mbpの間に位置している可能性が示唆された。congenic 2の齲蝕スコアと唾液分泌量はB6-Chr.2<sup>C3H</sup>の齲蝕スコアと唾液分泌量と相似しなかったことから、齲蝕感受性に関与する遺伝要因がマウス第2番染色体上に複数存在する可能性が示唆された。マウス第2番染色体のこの領域は、ヒト染色体15番に相当する。この領域に存在する唾液分泌に関与する遺伝子が同定され、マウスにおける遺伝子機能の違いが解明されれば、ヒトの同じ遺伝子に応用することで、口腔内細菌に的を絞った齲蝕予防にだけでなく、宿主遺伝子の活性化により唾液分泌を促進させ、齲蝕予防に対する新たなアプローチの開発に貢献できると考えられる。

#### <引用文献>

- 1) 清水邦彦、前田隆秀：う蝕症のモデルマウス、アニテックス、16(3)、5-9、2004.
- 2) T Uematsu, M Nariyama, K Shimizu, T Maeda: Mapping of affected gene(s) to dental caries susceptibility on mouse chromosome 2, *Ped. Dent. J.*, 13(1): 75-81, 2003.
- 3) M Nariyama, K Shimizu, T Uematsu, T Maeda: Identification of Chromosomes Associated with Dental Caries Susceptibility Using Quantitative Trait Locus Analysis in Mice, *Caries Res.*, 38, 79-84, 2004.
- 4) D Orino, K Shimizu: Reduced dental caries susceptibility in chromosome 2- substituted consomic mice, *IJOMS*, 9(3): 234-240, 2011.
- 5) C Watanabe, D Orino, K Shimizu: Investigation of the effects of the chromosomal regions of mouse chromosome 2 on susceptibility to dental caries using congenic strains, *Ped. Dent. J.*, 29(1): 11-16, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Chihiro, Orino Daisuke, Shimizu Kunihiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Investigation of the effects of the chromosomal regions of mouse chromosome 2 on susceptibility to dental caries using congenic strains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 11～16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdj.2018.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊 千尋, 井上 雄温, 折野 大輔, 遠藤 智佳, 清水 邦彦, 清水 武彦, 三浦 保紀
2. 発表標題 齲蝕感受性に関わる染色体領域の限定
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊千尋, 折野大輔, 清水邦彦, 清水武彦
2. 発表標題 マウス齲蝕感受性に関する遺伝要因の探索
3. 学会等名 第55回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 C. Watanabe, K. Shimizu, D. Orino, T. Shimizu
2. 発表標題 Establishment of Congenic Mice to clarify Host Susceptibility to Caries
3. 学会等名 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----