

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2017
課題番号：16K20641
研究課題名(和文)エナメル質形成におけるprimary ciliaの役割

研究課題名(英文)The role of primary cilia in amelogenesis

研究代表者

川崎 勝盛(kawasaki, katsushige)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40529640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：織毛病の一つである口顔指症候群I型(OFD1)は、エナメル質形成不全を示す。Cre-LoxPシステムを利用してOfd1上皮特異的欠損マウスを作成し、Ofd1によるエナメル形成における機能解析を行った。走査型電子顕微鏡(SEM)による観察の結果、Ofd1上皮特異的欠損マウスの臼歯は野生型と比較して非常に強い摩耗を示した。また、qPCRの結果から、Gli1の発現が有意に減少していた。以上の事からOfd1はマウスのエナメル形成においても、重要な機能を有していることが明らかとなった。Ofd1特異的欠損マウスエナメル質形成不全は、分泌期のShhシグナルの低下による可能性の高いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Key features of the oral-facial-digital syndrome type 1 (OFD1) include amelogenesis imperfecta (AI). We generated epithelium-specific mutations of Ofd1 using the Cre/loxP-recombination system, and analyzed the role of in amelogenesis. The cKO teeth by SEM analysis showed dental attrition of the molar cusps in three-days-old mice as compared to the control. Real-time PCR analysis showed that Gli1 mRNA levels decreased significantly in ameloblasts of cKO mice. These results demonstrate that Ofd1 has important roles in Amelogenesis in murine teeth. We suggested that the amelogenesis imperfecta on the Ofd1 cKO mice associated with Shh pathway.

研究分野：発生学

キーワード：一次繊毛 エナメル質 エナメル質形成不全

1. 研究開始当初の背景

エナメル質は有機質をほとんど含まず、非常に規則性の高い結晶で形成される生体で最も硬い組織である。その形成過程では数種のエナメルタンパクが合成・分泌され、それらが規則正しく結晶へと置換していく。このような非常に複雑かつ精緻な過程により形成されるため、エナメル質の形成異常は、その異常の発生時期や分子の動態によって大きく変化し、その症状は多様となる。このような複雑なエナメル形成を培養細胞で再現することは不可能であり、*in vivo* による解析がエナメル形成のメカニズム解明には不可欠であった。しかしながら、野生型マウスによる解析のみでエナメル形成メカニズムの全てを解明していくのは非常に困難であり、遺伝子の改変を伴った研究が必須である。これまで、エナメル質関連タンパク欠損マウスによる解析は多数行われているものの、エナメル形成メカニズムには未解明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

一次繊毛 *primary cilia* は脊椎動物のほぼ全ての細胞に認められるものの、長い間、存在意義の不明な細胞小器官であった。しかし、近年の分子生物学の急速な発展により、一次繊毛が細胞運動、外液移動、化学受容、光受容、機械受容、シグナル伝達等の多機能を有することが明らかにされている。この一次繊毛の機能不全は、ヒトでは繊毛病と総称される疾患を引きおこし、多様な臓器に先天異常を呈する。この繊毛病の多くにはエナメル質形成異常が認められ、エナメル質が全く形成されないエナメル質形成不全、エナメル質形成が部分的に生じないエナメル質減形成、エナメル質の石灰化度が低いエナメル石灰化不全など多様であり、一次繊毛がエナメル質形成の様々な場面で役割を有していることを示している。

繊毛病の一つである口顔指症候群 I 型 (OFD1) も、エナメル質形成不全を示す。しかし、その原因遺伝子として同定された *Ofd1* の欠損マウスは胎生初期に致死となるため、エナメルの解析が不可能であった。そこで、*Cre-LoxP* システムを利用して *Ofd1* 上皮特異的欠損マウスを作成し、*Ofd1* によるエナメル形成における機能解析を目的に、本研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) エナメル芽細胞における一次繊毛の存在の確認

オルガネラである一次繊毛の詳細な形態の確認は、超微構造として電子顕微鏡で検索するしかないが、*acetylated α -tubulin* をマーカーとして、光顕レベルでその局在は確認することが可能である。そこで、エナメル芽細胞における一次繊毛の局在を調べるために、*acetylated α -tubulin* の免疫染色を行なった。

(2) 走査型電子顕微鏡 (SEM) によるエナメル質の観察

Ofd1 上皮特異的欠損マウスのエナメルの摩耗度を検索するために、*wild-type* マウス、*Ofd1* 上皮組織特異的欠損マウス双方の臼歯歯冠の走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察を行なった。

(3) *Ofd1* の制御分子の検索

エナメル形成には、様々なシグナルが関与していることが知られている。エナメル形成において、*Ofd1* が制御しているシグナルの同定を、エナメル芽細胞から抽出した RNA を用いて qPCR にて行なった。

4. 研究成果

(1) エナメル芽細胞における一次繊毛の存在の確認

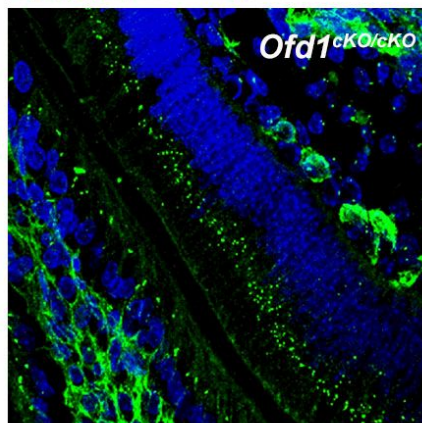
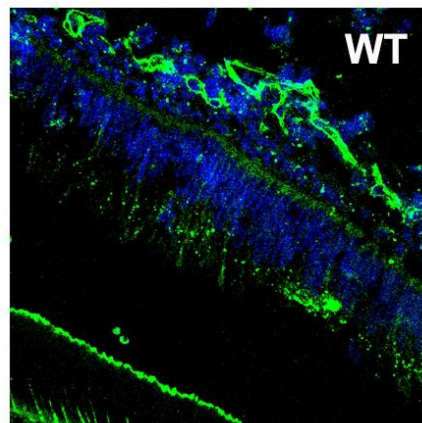


図1: acetylated α -tubulin の免疫染色。
 (上段) P3 の Wild-type マウスのエナメル芽細胞。
 (下段) P3 の *Ofd1* 上皮組織特異的欠損マウスのエナメル芽細胞

一次繊毛は胎生初期には左右軸の決定に関わり、その後の様々な場面でも細胞極性の制御に関わると考えられている。本研究の対象であるエナメル芽細胞は時期に応じて核が一端に局在するという非常に極性をもつ細胞である。極性をもつ分泌期のマウス歯胚での一次繊毛の局在を、acetylated α -tubulin の免疫染色にて確認したところ、WTにて規則性のある配列を認めた。*Ofd1* 上皮組織特異的欠損マウスのエナメル芽細胞における acetylated α -tubulin の発現部位に大きな変化は認められなかった。一方、WTでは acetylated α -tubulin が線状に認められたが、*Ofd1* 上皮組織特異的欠損マウスでは点状に観察された。

(2) 走査型電子顕微鏡 (SEM) によるエナメル質の観察

Ofd1 上皮特異的欠損マウスのエナメルの摩耗度を検索するために、wild-type マウス、*Ofd1* 上皮組織特異的欠損マウス双方の臼歯歯冠の走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察を行なった。

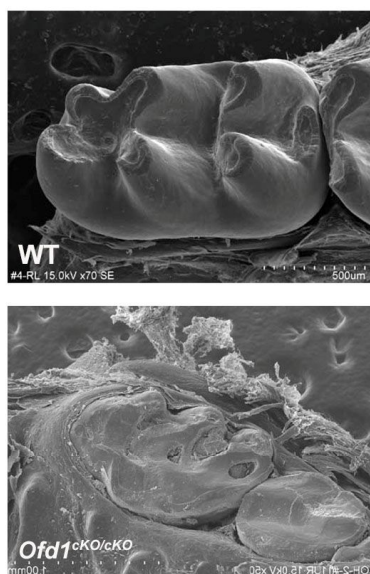


図2: 臼歯のSEM像。(上段) P3 の Wild-type マウスの歯冠。(下段) P3 の *Ofd1* 上皮組織特異的欠損マウスの歯冠

Ofd1 上皮組織特異的欠損マウスの臼歯には、著しい摩耗が観察された。

(3) *Ofd1* の制御分子の検索

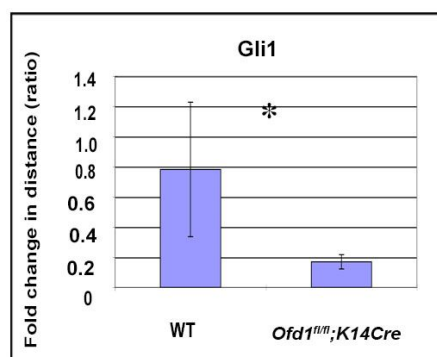


図3; エナメル芽細胞からの RNA を用いた *Gli1* の qPCR。* <0.05

エナメル形成には、Shh シグナル、Fgf シグナル、Wnt シグナルなど様々なパスウェイが関与することが知られている。WT マウスと *Ofd1* 上皮組織特異的欠損マウスの分泌期のエナメル芽細胞から抽出した RNA を用いて、qPCR 解析を行なったところ、*Ofd1* 上皮組織特異的欠損マウスのエナメル芽細胞における *Gli1* (Shh シグナルのマーカ) が優位に減少していることが明らかになった。

以上のことから、*Ofd1* はマウスのエナメル形成においても、重要な機能を有していることが明らかとなった。*Ofd1* 上皮組織特異的欠損マウスエナメル質形成不全は、分泌期の Shh シグナルの低下による可能性の高いことが示唆された。

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 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
 出願状況(計 0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

川崎 勝盛 (KAWASAKI, Katsushige)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号： 40529640

(2)研究分担者

()

(3)連携研究者

()

研究者番号：