

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390534
 研究課題名（和文） RNAi 法を用いた歯根形態形成誘導に関与する主要遺伝子の同定と機能解析
 研究課題名（英文） Molecular genetics study of gutter-shaped root (GSR) in inbred mice using RNAi analysis.
 研究代表者
 朝田 芳信 (ASADA YOSHINOBU)
 鶴見大学・歯学部・教授
 研究者番号：20184145

研究成果の概要（和文）：AKXL recombinant inbred mice を用いた QTL 解析、Microarray 法による網羅的遺伝子発現解析ならびに Real time PCR 法による遺伝子発現レベルの経時的観察の3つのアッセイ系から、C57L マウスにみられる樋状根成因には上皮隔膜の伸長パターンに関与する *Shh* signal pathway が重要な役割を演じていることがわかった。とくに、11日齢における *Shh* の急激な発現レベル低下が原因となり上皮隔膜の伸長が停止し、癒合根を呈する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：A detailed study using Quantitative trait locus (QTL) analysis, microarray and Real time PCR revealed that gutter-shaped root (GSR) formation in the C57L/J mice is strongly controlled by the genetic factor(s). It is well known that *Shh* signaling pathway is associated with the extension of the epithelial diaphragm (ED). It is suggested that the arrested development of ED in the C57L/J mice is caused by the fall of expression level of the *Shh* gene at 11days after birth. We concluded that GSR formation in the C57L/J mice is regulated by signaling factors such as *Shh* pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：樋状根、Real time PCR、Gene Chip、QTL 解析、*Shh* 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ヒトの歯の発生を分子レベルで知るためにモデル動物が研究に用いられているが、とくにマウスの歯の発生から多くの知見が得られている。すでに歯冠の形態形成については、

多くの研究から上皮-間葉組織における相互作用が解明されつつある。すなわち、歯胚の発生初期の主導権をもつ上皮内には sonic hedgehog (*Shh*)、bone morphogenetic protein 4 (*Bmp4*)、fibroblast growth factor 8 (*Fgf8*)

が存在しシグナルをだす。*Bmp4* および *Fgf8* は間葉での homeo box, *msh like 1 (Msx1)* ならびに paired box homeotic gene 9 (*Pax9*) の発現を調節することが知られている。*Msx1* は将来前歯のできる領域で、*Pax9* は臼歯のできる領域で強く発現する。*Msx1* は *Bmp4* と *Fgf8* の両方のシグナルにより誘導され、*Pax9* は *Fgf8* によって誘導されるが、*Bmp4* によって阻害される。このように *Pax9* に対する *Bmp4* と *Fgf8* の拮抗作用が存在することにより *Msx1* ならびに *Pax9* の発現領域の調節が行われている (Cell 90: 247-255, 1997, Science 282: 1136-1138, 1998, Tooth development, 59-64, 1999.)。当然、歯冠の形成に引き続いて起こる歯根の形成⁴⁾においても、歯冠形成にみられる遺伝子間の拮抗的作用が働くことで単根あるいは複根、歯根の長さを調節しているとの仮説を立てることができる。

(1) 槌状根成因に関与する候補遺伝子の特定: Recombinant inbred mice (組み換え近交系マウスをさす) と Classic genetic cross (近交系マウス同士を交配して作成した N2 backcross mice を意味する) より作製した N2 backcross mice の2つの動物実験系を用い、Quantitative trait loci (QTL) 解析ならびに Gene Chip による歯根形態異常出現部位における遺伝子発現解析を行い、2つのアッセイ系で overlap する遺伝子を検索したところ、歯根形成を誘導する主要遺伝子と考えられている *Shh*, *Bmp4*, homeo box, *msh like 2 (Msx2)* との遺伝子相互作用が報告されていない neuropeptide Y (NPY) が候補遺伝子となることが示唆され、新たな遺伝子の関与が疑われた。

(2) *Shh* signal pathway の役割について: 歯根の形態形成において、とくに歯根数を決定する遺伝子相互作用として、上皮隔膜の伸長パターンに関与する *Shh* signal pathway の役割が報告されている【J Dent Res 85(5): 427-431, 2006】。

そこで、癒合根の成因に関与する主要遺伝子の同定ならびに機能解析を進めることで歯根の初期形成に関与する遺伝子相互作用を解明することは、歯の再生プロジェクトに対する有益な情報を提供するばかりでなく、インプラントに代わる再生歯根の可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

前述の作業仮説を実証するため、槌状根成因に関与する主要遺伝子の同定ならびに機能解析を目指す。

(1) 詳細な量的遺伝解析による候補染色体の特定: すでにマウス染色体6番、7番、8番染

色体が候補染色体となり、とくに6番染色体に主要遺伝子が存在する可能性が示唆されているが、さらに詳細な量的遺伝解析を進めることで、遺伝子相互作用という点から主要遺伝子の特定を試みる。

(2) Microarray 法を用いた網羅的遺伝子発現解析: Recombinant inbred mice ならびに N2 backcross mice を用いた QTL 解析から特定された NPY 遺伝子が主要遺伝子となり得るのか、あるいは *Shh* signal pathway 関連遺伝子群の関与が存在するのかを検討する。

(3) 標的遺伝子に対する遺伝子構造解析: 上述(1)の解析結果から導き出された染色体6番上に存在する候補遺伝子である NPY 遺伝子とその近傍に位置する Transforming growth factor alpha (Tgfa) の遺伝子構造解析を行う。

(4) Real time PCR 法を用いた遺伝子発現解析: 上述の(1)から(3)の解析から導き出された遺伝子群の遺伝子発現量を経時的に観察することで、槌状根成因に関与する主要遺伝子の同定ならびに遺伝子相互作用を解明する。

3. 研究の方法

(1) Recombinant inbred (RI) mice を用いた QTL 解析

① RI mice の選別

1) 供試マウス

交雑第一世代における槌状根の出現頻度を検討し、遺伝解析に有用な RI マウスの選別を行うことを目的に、槌状根を有する C57L/J マウスと槌状根を有さない近交系マウス (AKR/J, BALB/cAnNCr1Cr1j, C3H/HeJ, C57BL/6J, DBA/2J) との交雑第一世代 (F1) を作製した。実験に使用したマウスは生後 21 日齢で離乳し、生後 35 日齢にてエーテル麻酔下で安楽死させ実験に用いた。

2) μ -CT を用いた dental root fusion rate の測定

生後 35 日の F1 マウスから下顎骨を摘出し、通法に従い軟組織を除去後、下顎第二臼歯を抜去した。抜去した歯を μ -CT にて撮影し、得られたデータを画像解析ソフトにて解析し、通法に従って dental root fusion rate (DRFR) を測定し表現型とした。DRFR が最も高い F1 マウスを指標に RI mice の選別を行った。

② AKXL RI マウスを用いた QTL 解析

C57L/J マウスと AKR/J マウス、並びにこの 2 系統より作出された AKXL RI 系統 (6、9、13、14、16、17、21、37、38) のマウスを実験に用いた。各系統の下顎第二臼歯を抜去し、通法に従い DRFR を算出し表現型として用いた。一方、遺伝子型の判定には常染色体上に存在する 201 個の DNA マーカーを用いた。得られた表現型と遺伝子型をもとに QTL 解析を行い、

解析には map manager QTX b20 を用いた。permutation test の結果、suggestive(14.4) significant(20.6) highly significant(27.3) の値が得られた。なお、本研究で実施した動物実験計画については鶴見大学歯学部動物実験委員会の審査を経て承認を受けている。

(2)Microarray 法を用いた遺伝子発現解析

①供試マウス

C57L/J と C57BL/6 J マウス (10~13 日齢) を用い、両側下顎第二臼歯の歯根部ならびに歯根周囲骨を摘出し試料とした。

②total RNA の抽出と complementary RNA の作製

全ての試料は TRIzol を用いて total RNA を抽出し complementary DNA へ変換した。得られた cDNA より Agilent 社 Quick Amp Labeling kit を用いて、cRNA を作製するとともに CTP (Cyanine 3-CTP) を取り込ませ蛍光標識を行った。

③Microarray 解析

標識された cRNA をハイブリダイゼーションバッファーに加え、Whole Mouse Genome Oligo Microarray (4×44K) 上で 17 時間ハイブリダイズし、洗浄後 Agilent Microarray Scanner で Microarray のイメージを読み取り、Feature Extraction Software (v.9.5.3.1) にて各スポットの蛍光シグナルを数値化した。

(3) 遺伝子構造解析

C57L/J、AKR、C57BL/6 J マウス (28 日齢) を用い、過去の報告【基盤研究(B)、2005-2006】で候補遺伝子となった NPY、TGF α 遺伝子の構造解析を行った。各遺伝子に特異的なプライマーをプロモーター領域およびエクソンにデザインした。PCR から得られた specific band は、Genetic Analyzer ABI PRISM 310 を用いて塩基配列 (TA クローニング法) を決定し、点変異の有無を確認した。

(4)Real time PCR を用いた遺伝子発現解析

すでに、C57L マウスを用いた組織学的研究から生後 12 日齢前後で歯根の形態形成異常が出現することを見出している。そこで、C57L および C57BL マウスの生後 10 日~12 日齢における下顎第二臼歯の歯根形成初期部位の上皮側ならびに歯髓側 (間葉系) から実体顕微鏡を用いて組織を摘出後、RNA を抽出し RT-PCR 法で mRNA の発現を確認するとともに Real time RT-PCR 法により、歯根形成誘導関連遺伝子と考えられている Shh, Ptch1, Gli1 候補遺伝子の発現レベルを定量的に解析した。ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems 社) と TaqManGene Expression Assays プロダクトを用いて遺伝子発現定量解析を行った。

4. 研究成果

(1)RI マウスを用いた量的遺伝解析による候補染色体の特定

近交系マウス (AKR/J, BALB/cAnNCr1Crlj, C3H/HeJ, C57BL/6J, DBA/2J) との交雑第一世代 (F1) を作製し、最適な RI マウスの選別を行ったところ、図 1 に示すように交配した系統ごとの F1 の DRFR は、C57L/J×AKR/J (91.5%)、C57L/J×BALB/c (18.0%)、C57L/J×C3H/HeJ (35.4%)、C57L/J×C57BL/6J (50.0%)、C57L/J×DBA/2J (26.1%) の順であった。C57L/J マウスと AKR/J マウスとの交配から得られた F1 マウスにおいて、最も高い DRFR を示した。そこで、C57L と AKR との RI マウスである AKXL マウスを選択し QTL 解析を実施した。その結果、5 番染色体の D5Bir2 近傍領域 (13.0 cM) で suggestive 以上の値が得られた (図 2)。その他の染色体上では、suggestive 以上の領域はみられなかった。

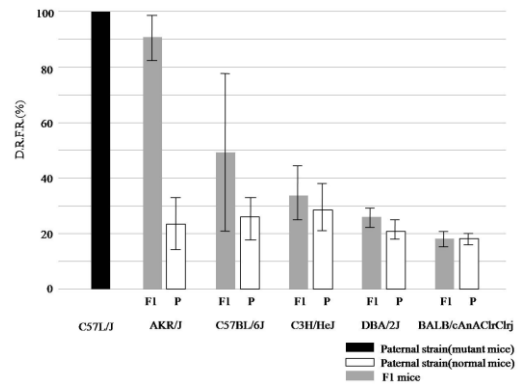


図 1

Chromosome 5

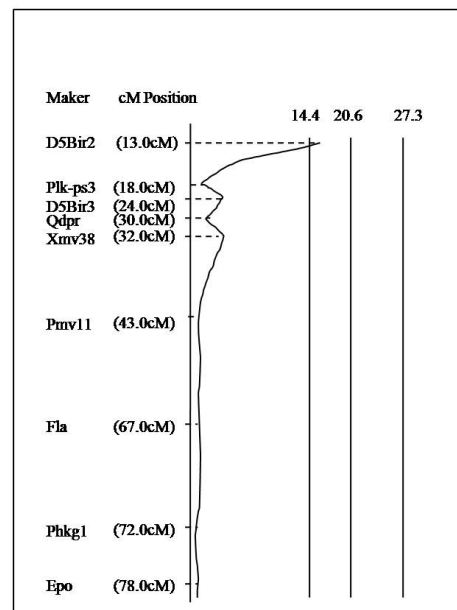


図 2

(2) Microarray 法を用いた網羅的遺伝子発現解析

Shh signaling pathway のうち Shh と Ptch1 では 11 日齢において C57BL/6J と C57L/J で明らかな差がみられた (図 3-1)。Shh, Ptch1, Gli1 における発現量の変化を経時的にみたときに、11 日齢で C57L マウスにおける発現量が C57BL マウスに比べ下がり、その後回復するという同様な傾向を示した (図 3-1 および 3-2)。Shh signaling pathway に関与する他の遺伝子群では発現量に差がみられなかった (図 4-1 および 4-2)。NPY, NPY1r の発現量は微量のため測定できなかった。

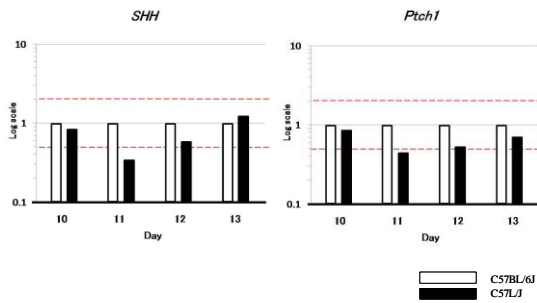


図 3-1 Gene chip data

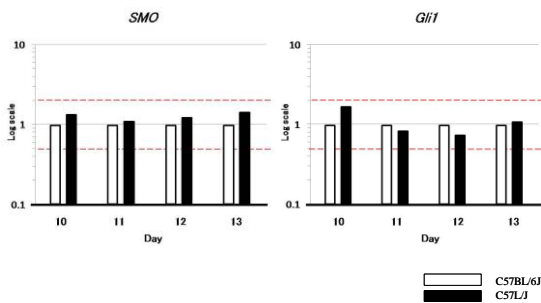


図 3-2 Gene chip data

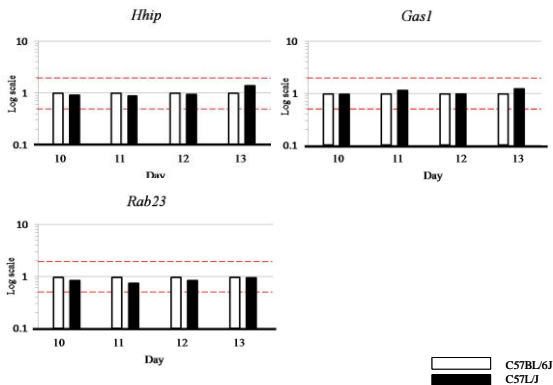


図 4-1 Gene chip data

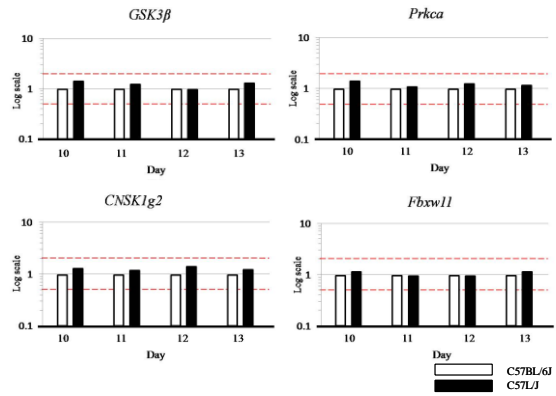


図 4-2 Gene chip data

(3) 標的遺伝子に対する遺伝子構造解析

C57L/J, AKR, C57BL/6J マウス (28 日齢) を用い、NPY、TGF α 遺伝子の構造解析を行ったところ、TGF α 遺伝子については 3 系統間で遺伝子構造に違いは認められなかった。しかし、NPY 遺伝子では、C57L マウスにおいてエクソン 2 部分の 69 番目のコドンが CCT (プロリン) であるのに対して、正常歯根を有する AKR、C57BL マウスではコドンが CCC (プロリン) となっていた (図 5-1、5-2 および 5-3)。アミノ酸に違いはみられないものの、槌状根を有する C57L マウスでは 238 番目の塩基が T から C に置換していた。

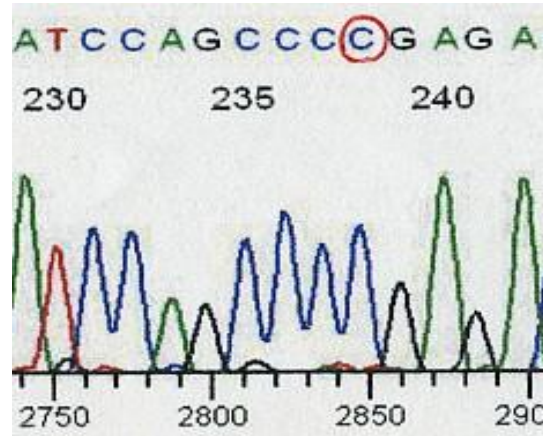


図 5-1 Sequence (neuropeptide Y) in C57L/J

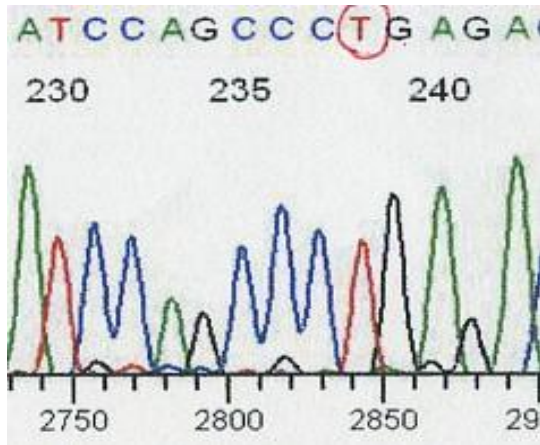


図5-2
Sequence (neuropeptid Y) in C57BL/6J

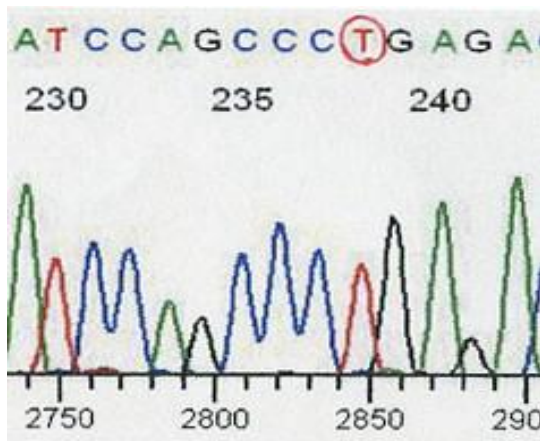


図5-3
Sequence (neuropeptid Y) in AKR/J

(4) Real time PCR を用いた遺伝子発現解析
C57L/J および C57BL/6J マウス (コントロール) を用い、生後 10~12 日齢の下顎第二臼歯歯根形成初期部位から試料を採取し、抽出した RNA をもとに Shh signaling pathway に関与する遺伝子群 (Shh, Ptch1, Gli1) の発現レベルを継時的に観察したところ、Shh の発現量に関しては、10 日齢では C57BL (コントロール) に比べ、C57L/J マウスで有意な差は認められなかったが、11 日齢でコントロールに比べ発現量が 25%以下に低下していた。しかし、12 日齢ではコントロールに比べ、C57L/J マウスで有意な差は認められなかった。一方、Ptch1 および Gli1 の発現量に関しては、10 日齢から 12 日齢にかけて、C57BL と C57L/J との間で有意な差は認められなかった (図6)。

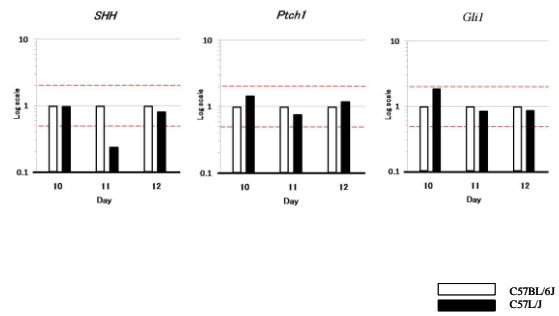


図6 Realtime-PCR

過去の報告から、槿状根の成因には遺伝要因が大きく関与し、その遺伝形式は常染色体優性遺伝であることが知られている。Arita ら (PDJ, 20(1):1-6, 2010) の報告では、染色体 6、7、8 番が有力な候補染色体となり、とくに染色体 6 番の 36.1 cM において highly significant QTL が得られ、その領域には Smo, NPY が存在し、また染色体 8 番上には NPY r が存在していた。また、suggestive 以上の領域として染色体 10 番上には Gli1 が存在することから、NPY ならびに Shh signaling pathway に関与する遺伝子群が、槿状根成因に関与している可能性が疑われた。しかしながら、Shh の存在する染色体 5 番が候補遺伝子として検出できなかったことから、今回 RI マウスを用いた詳細な QTL 解析を実施した。その結果、染色体 5 番上の D5Bir2 近傍領域 (13 cM) において suggestive 以上の値が得られ、Shh が候補遺伝子となることが示唆された。そこで、歯根形態形成異常を引き起こす生後 10 日から 13 日齢における網羅的遺伝子発現解析を Microarray 法で行ったところ、Shh signaling pathway に属する Shh, Ptch1 の発現量に差がみられた時期と形態形成異常の出現時期がほぼ一致したことから、Shh signaling pathway が槿状根成因に何らかの関与をしていることが示唆された。しかし、槿状根成因に対する候補遺伝子と考えられる Smo, Gli1 については発現量に差がみられなかったことから、Shh signaling pathway が槿状根成因にどのような形で関与しているのかは不明である。Microarray 法にて検出できなかった NPY 遺伝子については、その近傍に位置する TGF α とともに遺伝子構造解析を行ったところ、C57L マウスにおいてエクソン 2 部分の 69 番目のコドンが CCT (プロリン) であるのに対して、正常歯根を有する AKR, C57BL マウスではコドンが CCC (プロリン) と、アミノ酸組成に違いはみられなかったが、槿状根の出現頻度と 238 番目の塩基の SNP の違いとが、関連している可能性も疑われた。
上記の結果を総合的に判断し、槿状根成因に

はNPYならびにNPYr遺伝子による関与ではなく、Shh signaling pathway 関連遺伝子群の関与が強く示唆されたことから、生後10日から12日齢における局所的な遺伝子発現レベルを検討するため、Real time PCRを行った。そこで、遺伝子発現量を経時的に観察したところ、コントロールと比較したShh遺伝子においてのみ、11日齢において発現量が著しく低下していることがわかった。この時期は、槌状根形成時期と重なる時期に当たるため、槌状根成因にはShhの関与が強く示唆された。以上から、NPY遺伝子の機能とその役割については不明な点が多く、槌状根成因と直接的に結びつけるエビデンスは得られなかったが、AKXL RI マウスを用いた詳細なQTL解析、Microarray法による網羅的遺伝子発現解析ならびにReal time PCR法による遺伝子発現レベルの経時的観察の3つのアッセイ系から、C57L マウスの下顎第二臼歯にみられる槌状根成因(舌側のみ癒合)には上皮隔膜の伸長パターンに関与するShh signal pathwayが重要な役割を演じていることがわかった。さらに、生後11日齢におけるShhの発現量の低下が原因となり上皮隔膜の伸長が停止し、癒合根を呈する可能性が示唆された。しかしながら、舌側でのみ癒合するメカニズムの解明には至っていないことから、今後はin situ hybridizationならびにsiRNAを用いたknockdown法を実施することでメカニズムの解明を進める予定である。

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4件)

- ①I. Tashima, K. Arita, Y. Asada: Genetic study of gutter-shaped root (GSR) in AKXL RI mouse strains using QTL analysis, **J Oral Science**, 52(2), 2010. in printing (査読有)
- ②K. Arita, I. Tashima, K. Ikeda, H. Nishimura, Y. Arai, I. Saito, Y. Asada: Quantitative trait locus analysis of gutter-shaped root(s) in C57L/J mouse, **Pediatric Dent. J.** 20(1):1-6, 2010. (査読有)
- ③ Shinji Shimoda, Masumi Ohta, Yumna Mohideen, Tomoko Ohshima, Nobuko Maeda, Kenzo Kawasaki and Yoshinobu Asada: A volume Evaluation of Dental Caries in a Mouse with the Use of the Micro-CT Scan, **J Hard Tissue Biol.** 17(3):109-114, 2008. (査読有)
- ④Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, Higashiyama H, Idaira Y, Asada Y, Kitamura H, Yamasaki S, Hojyo S,

Nakayama M, Ohara O, Koseki H, Santos, H. G. Bonafe L, Ha-Vinh R, Zankl A, Unger S, Kraenzlin, M. E. Beckmann J. S., Saito I, Rivolta C, Ikegawa S, Superti-Furga A, Hirano T: The Zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective Tissue development; its involvement in BMP/TGF- β signaling pathways, **PLoS ONE.** 3(11), e3642, 2008. (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ①田島格、有田浩一郎、伊平弥生、友広忠文、朝田芳信、槌状根成因に対するsonic hedgehog signaling pathwayの関与について、第47回日本小児歯科学会学術大会、2009年5月14-15日、大阪。
- ②伊平弥生、下田信治、深田俊幸、朝田芳信、Zip13の歯根膜の恒常性とその再生における役割、第47回日本小児歯科学会学術大会、2009年5月14-15日、大阪。
- ③田島格、有田浩一郎、伊平弥生、古宇田ゆき、朝田芳信、QTL解析を用いた槌状根成因に対する主導遺伝子の局在、第45回日本小児歯科学会学術大会、2007年7月19-20日、東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝田 芳信 (ASADA YOSHINOBU)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：20184145

(2) 研究分担者

伊平 弥生 (IDAIRA YAYOI)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：40200018
井上 裕子 (INOUE HIROKO)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：50367306
美島 健二 (MISHIMA KENJI)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号：50275343
斎藤 一郎 (SAITO ICHIRO)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：60147634