

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19592368

研究課題名（和文） 咬耗の遺伝要因に関する研究

研究課題名（英文） Genetic study on dental attrition in mice

研究代表者

前田 隆秀 (MAEDA TAKAHIDE)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：70130599

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は咬耗に関与する主要遺伝子が存在する染色体の特定である。咬耗感受性の異なる2系統の近交系マウスを交配させ、得られたF2マウスのうち咬耗が強い4匹から得られたDNAをpool High、咬耗が少ない4匹から得られたDNAをpool Lowとし、2系統間で多型を有する計53個のMitプライマーを使用しDNA pool RCR法を行った。D4Mit13およびD13Mit9においてpool Highで遺伝子型はC3Hホモ型タイプ、pool Lowで遺伝子型はB6ホモ型タイプであったため、この近傍に咬耗に関与する遺伝子が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify the chromosomes harboring candidate causative gene(s) for dental attrition using pools of DNA from two strains mice with different susceptibilities to attrition. Attrition scores in F2 mice aged 260 days obtained by genetic crossing of C3H and B6 mice ranged from low to high. DNA from four F2 mice with high attrition scores and four F2 mice with low attrition scores was pooled. The 53 Mit markers used in this study were determined as informative markers, being polymorphisms between C3H and B6, and were distributed among all auto chromosomes in mice. This suggests that the candidate chromosomes harboring causative gene(s) for attrition are linked with D4Mit13 and D13Mit9, which were identified as homozygous alleles of C3H in Pool High DNA and homozygous alleles of B6 in Pool Low DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：矯正・小児歯科学

キーワード：咬耗、連鎖解析、候補遺伝子

1. 研究開始当初の背景

咬耗は、上下の歯の直接的な接触および食物などを介した間接的な接触によって生じると考えられる。高齢者で著明に認められるが、高齢者特有のものではなく、小児においても稀に高度の咬耗を認めることがある。現

在までに咬耗についてさまざまな報告があるが、その発症に遺伝要因が関与しているか否かについては未だ明確でない。当教室では、近交系マウスを粉状高脂食下にて飼育し咬耗について検討した結果、C3H系統マウスが咬耗高感受性マウス、C57BL/6系統が咬耗低

感受性マウスであり、これらを親系統とした交配実験により得られた F2 マウスは、咬耗高感受性マウスと低感受性マウスに分離されることを報告した。さらに親系統マウスを用いて咬耗に関連する因子について検討を行い、下顎角、唾液量に違いがあることを報告した。

2. 研究の目的

咬耗発症の候補遺伝子座を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスおよび飼料

高感受性マウスである C3H/HeJS1c (以下 C3H) マウス (5 匹) と低感受性マウスである C57BL/6JS1c (以下 B6) マウス (5 匹) を用いて遺伝的交雑を行い、F2 マウス雄 16 匹を得た。この F2 マウスを 21 日齢より高脂食 (表 1: High-cholesterol diet) 下にて飼育した。また蒸留水を飲料水として、飼料、飲料水ともに自由摂取とした。

表 1: High-cholesterol diet

組成	量
cocoa butter	15%
sucrose	50%
casein	20%
corn oil	1%
cellulose	5.07%
AIN-76 mineral mix	5%
AIN-76 vitamin mix	1%
choline chloride	1%
DL-methionine	0.30%
DL- α -tocopherol	0.13%
sodium cholate	0.50%
Cholesterol	1%

(2) 咬耗状態の評価

C3H 系統、B6 系統および F2 マウスを 260 日齢にて CO₂ を用いて安楽死後、左右の下顎骨と肝臓を摘出した。下顎骨は 1%KOH を用いて、下顎骨の軟組織を除去し骨格標本を製作した。下顎臼歯部を Micro-CT

(TOSCANER-31300 μ hd) 撮影し、得られた画像を 3 次元構築し、露出象牙質の面積を求め、これを咬耗面の面積とした。それぞれのマウスの歯の大きさを考慮し咬耗面の面積を歯冠の大きさにて割り、これにより咬耗状態を判定した。

(3) DNA の抽出

肝臓を用いて DNeasy Tissue Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出した。

(4) DNA pool PCR 法

F2 マウスのうち、咬耗が強く認められた 4 匹から得られた DNA をプールしたものを pool

High とした。一方、低感受性マウス 9 匹のうち、咬耗が少なかった 4 匹から得られた DNA をプールしたものを pool Low とした。これを用いて咬耗に関連する候補遺伝子の特定を目的として DNA pool PCR 法を用いた。

(5) PCR

C3H と B6 マウス間において多型を有する計 53 個の Mit プライマーを使用した。抽出 DNA を鋳型とし、染色体上に存在する Mit プライマーを用いて PCR で増幅した。PCR 条件は、94°C 3 分 (94°C ; 1 分 55°C ; 1 分 72°C ; 1 分) 35 サイクル 72°C ; 10 分で行った。

(6) 遺伝子型判定

PCR 産物を 4% アガロースゲルに電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV ライト上で DNA フラグメントを可視化し、遺伝子型の判別を行った。

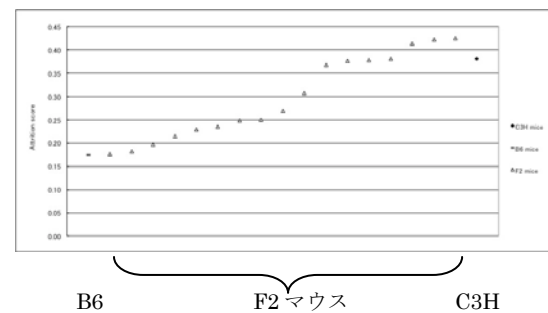
4. 研究成果

(1) 咬耗状態の評価

咬耗状態は高感受性マウスである C3H マウス (5 匹) で 0.38 ± 0.07 、と低感受性マウスである B6 マウス (5 匹) で 0.17 ± 0.05 であった。

一方、F2 マウス (16 匹) の咬耗状態は広範囲に分布した (表 2)。この F2 マウスのうち、pool High (咬耗が強く認められた 4 匹) は 0.40 ± 0.02 、pool Low (咬耗が少なかった 4 匹) は 0.19 ± 0.02 であり、2 群間に有意差が認められた ($p < 0.000001$)。

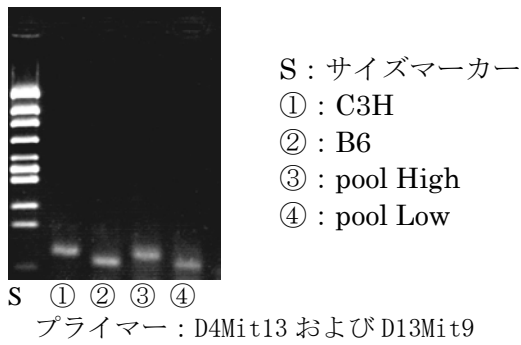
表 2: 咬耗状態の分布状況



(2) pool DNA を用いた遺伝子型の判定

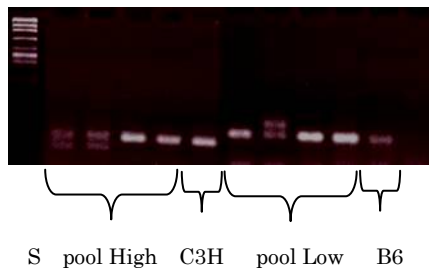
pool High および pool Low を用い、咬耗に関連する候補遺伝子の特定を目的として DNA pool PCR 法を行ったところ、D4Mit13 および D13Mit9 において pool High で遺伝子型は C3H ホモ型タイプ、pool Low で遺伝子型は B6 ホモ型タイプであった。(図 1)

図1：pool PCR法による遺伝子型の判定



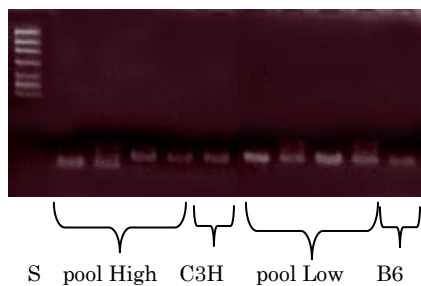
以上の結果より、D4Mit13 および D13Mit9 における F2 マウスの遺伝子型を詳細に判定するため、pool High および pool Low の DNA を用いて個々のマウスごとに PCR 法を行った。

図2：D4Mit13 における遺伝子型の判定



D4Mit13 において、pool High で遺伝子型は C3H ホモ型タイプ 2 匹、ヘテロ型タイプ 2 匹であった。一方 pool Low で遺伝子型は B6 ホモ型タイプ 3 匹、ヘテロ型タイプ 1 匹であった。

図3：D13Mit9 における遺伝子型の判定



D13Mit9 において、pool High で遺伝子型は C3H ホモ型タイプ 1 匹、ヘテロ型タイプ 1 匹 B6 ホモ型タイプ 2 匹であった。一方 pool Low で遺伝子型は B6 ホモ型タイプ 2 匹、ヘテロ型タイプ 2 匹であった。

本研究結果より理論的な遺伝子型と合致する遺伝子マーカーは、D4Mit13 と D13Mit9 であったことから、第 4 番および 13 番マウ

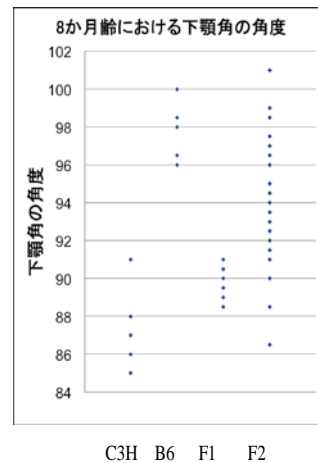
ス染色体が候補染色体であり、第 4 番染色体の 71cM 付近および第 13 番染色体の 26cM 付近に咬耗に関する候補遺伝子が存在する可能性が示唆された。

また、これら染色体上に存在する Slc9a1、Prdm16、Fgf10、Chrm3、Edn1、Ocln、Pitx1 遺伝子は下顎骨で発現しており、咬耗発症に関与する候補遺伝子になりえると考えられた。

(3) その他

親系統マウス間で下顎角の角度に有意差があることが報告されているため、咬耗に関連するか否かについて検討を行った。

表3：下顎角の角度の分布状況



下顎角の角度は C3H 系統の方が B6 系統よりも小さく、F2 マウスは広範囲に分布した。咬耗状態と下顎角の角度には相関関係が認められず、下顎角の角度が咬耗に関連している可能性は低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 1 件)

① Kei Ogawa, Chiaki Tatsumi, Elif Bahar Tuna, Takahide Maeda, : Mapping of affected Genes to Dental Attrition Susceptibility Using pool DNA in Mice, International J of Oral-Medical Science, 10, 51-56, 2011.

〔学会発表〕 (計 2 件)

小川京、辰巳千明、清水邦彦、前田隆秀 : 「近交系マウス系統間における下顎角の大きさの比較および遺伝要因の検討」

第 48 回 日本小児歯科学会大会 発表、愛知 (名古屋国際会議場) 2011 年 5 月 19 日

②小川京、成島順子、清水武彦、清水邦彦、
前田隆秀：「SMXA Recombinant 近交系マウス
を用いた下顎角の大きさを規定する遺伝子
の量的形質遺伝解析」

第 47 回 日本小児歯科学会大会 発表、大
阪（大阪大学コンベンションセンター）、2010
年 5 月 14 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 隆秀 (MAEDA TAKAHIDE)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号：70130599

(2) 研究分担者

小川 京 (OGAWA KEI)
日本大学・松戸歯学部・助教
研究者番号：20453889