

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06302・19K21390

研究課題名(和文) Sox21-アメロプラスチン共役におけるエナメル芽細胞の分化制御機構の解明

研究課題名(英文) AMBN and Sox21 regulate the differentiation of ameloblast

研究代表者

山口 知子 (Yamaguchi, Satoko)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：00821836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯の発生メカニズムを明らかにするため、エナメル質形成に関与する遺伝子である AMBN と Sox21 のノックアウトマウス (AMBN-KO、Sox21-KO) 及びそれらを交配したダブルノックアウトマウス (W-KO) を解析した。表現型を解析した所、AMBN-KO、Sox21-KO、W-KO の全てにエナメル質形成不全を認めた。切歯を SEM で撮影し EDX 解析したところ、AMBN-KO では無機物の含有率が増加し、Sox21-KO では有機物の含有量が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の小児歯科では、MIH (Molar-Incisor Hypomineralization) が注目を集めている。MIH とは、第一大臼歯と切歯に限局して発生するエナメル質形成不全であり、2000 年頃より諸外国で散発的に報告が認められた。原因としては諸説あるが、未だ確定には至っていない。エナメル質形成不全では健全歯と比較し齲蝕の罹患率が高く、早期発見と予防処置が重要である。歯の発生の分子生物学的なメカニズム解析により、これらの疾患の遺伝子診断や早期発見は一層発展するだろう。

研究成果の概要(英文)：We analyzed knockout mice of (AMBN-KO, Sox21-KO) and double knockout mouse (W-KO) to clarify development of tooth mechanism. We detected amelogenesis imperfection in AMBN-KO, Sox21-KO, and W-KO. Inorganic contents increased in AMBN-KO, and organic content increased in Sox21-KO by EDX analysis.

研究分野：小児歯科

キーワード：再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療において臓器や器官の発生過程の理解は必要不可欠である。歯は外胚葉器官の1つで上皮-間葉相互作用により形成される。当研究室では、歯の発生を通して外胚葉器官の発生メカニズムを分子生物学的に解析しており、その中でも歯のエナメル質に特異的に存在し、歯の発生に関与するエナメルマトリクスであるアメロプラスチン(Ameloblastin: AMBN)に注目し、遺伝子を欠損させたノックアウトマウス(AMBN-KO)の作製に成功した。AMBN-KOでは野生型マウス(Wild type: WT)と比較して重度のエナメル質形成不全を呈した。このことから、AMBNはエナメル質形成に必須の分子であることが示された。さらに詳細な解析により、AMBNが骨などの硬組織にも影響を与えることが示唆された。しかし、その具体的なメカニズムには依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、歯のエナメル質形成におけるAMBNとSox21の役割解明を目的とする。これまで我々は、歯の発生に関与するAMBNに注目し、ノックアウトマウス(AMBN-KO)の作製に成功した。AMBN-KOでは重度のエナメル質形成不全歯を有した。更にこのAMBN-KOの解析から、AMBNが骨などの硬組織に影響を与えることが示唆された。また、AMBNと同様に硬組織の発生に関与する遺伝子として、Sox familyがある。このSox familyのうち、Sox21のノックアウトマウス(Sox21-KO)は重度のエナメル質形成不全歯を有した。硬組織、特に歯におけるSox21の機能について解析し、またエナメル芽細胞に同様に発現が認められるAMBNとの関連性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

マウスはC57BL6/J系統を本研究で使用した。今回の実験において、ノックアウトの標的となる遺伝子は、AMBNとSox21であった。それらを交配させてAMBN(-/-)Sox21(-/-)(W-KO)マウスを作成した。

(2) Scanning Electron Microscope (SEM)

6週齢のWT、AMBN-KO、Sox21-KO、W-KOのマウス(以下各マウス)の各々の頭部を解剖摘出し、軟組織を除去、乾燥させた後、エポキシ樹脂に試料を包埋した。切断後、表面処理をした。各々の切歯と臼歯は、走査顕微鏡でスキャンし、解析した。また、元素解析を行うため、エネルギー分散型X線分析(EDX)で解析した。

(3) ヘマトキシリン-エオジン染色

各マウスの下顎骨を解剖摘出した。それらを4%PFA/PBSで4 一晩固定し、12.5%EDTA/4%PFA/PBSを用いて4 で8週間脱灰した。乾燥後、パラフィン置換し、パラフィンワックスで包埋し、前頭断で連続薄切した。歯の形態学的解析のため、ヘマトキシリン-エオジン染色(H-E染色)を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子欠損マウスの表現系解析

各マウスの下顎切歯を実体顕微鏡下にて撮影した写真を比較した。WTと比較した場合、AMBN-KO、Sox21-KO、W-KOマウスは、エナメル質に白濁や実質欠損などの形成不全が認められ、切歯の切縁部に著しい咬耗が認められた。

(2) SEMによるエナメル質性状の解析

各マウスの下顎切歯と臼歯のSEM画像を撮影し比較した。WTマウスでは、エナメル質の表面は滑沢であった。また、規則的で明瞭なエナメル小柱が観察された。AMBN-KOマウスでは、エナメル質の表面は粗造であった。エナメル質の厚みはWTマウスより減少した。また、エナメル

小柱構造のような規則的な構造は観察されなかった。Sox21-KO マウスでは、エナメル質の表面が粗造であった。エナメル質の厚みは WT マウスより減少した。また、エナメル小柱のような規則的な構造は観察されなかった。W-KO マウスでは、エナメル質の表面は粗造で、その粗造感は AMBN-KO マウスに類似した。エナメル質の厚みは WT マウスや Sox21-KO マウスより減少した。また、AMBN-KO マウスや Sox21-KO マウスと同様に、エナメル小柱のような規則的な構造は観察されなかった。

各マウスの下顎臼歯の SEM 画像を撮影し EDX により主要元素の含有率を質量比で比較した。WT マウスと比較した場合、AMBN-KO、Sox21-KO、W-KO マウスにおいて、カルシウムやリンなどの無機物や炭素などの有機物といったエナメル質の構成元素の含有率には有意差が認められた。エナメル質の構成元素を WT マウスと比較すると、AMBN-KO マウスでは、有機物の含有率は減少し、無機物の含有率が増加した。WT マウスと比較すると、Sox21-KO マウスでは、有機物の含有率は増加し、無機物の含有率は減少した。W-KO マウスでは、Sox21-KO マウスと比較すると有機物の含有率が増加し、AMBN-KO マウスと比較すると無機物の含有率が減少した。

(3) 遺伝子欠損マウスの切歯の組織学的検討

各マウスの下顎切歯を冠状平面で切片を作成し、パラフィン切片を H-E 染色し、比較した。WT マウスでは、エナメル芽細胞は細胞極性を有し細長い細胞となり、規則的な単層構造を呈した。AMBN-KO マウスでは、歯頸部領域にてエナメル質の幅は WT マウスと比較して減少した。また、エナメル芽細胞は細胞極性を失い丸く小さい細胞となり、多層構造を呈した。エナメル芽細胞層の中に不定形の Sox21-KO マウスでは、歯頸部領域にてエナメル質の幅は WT マウスと比較して変化が認められなかった。また、エナメル芽細胞は細胞極性を失い小さい細胞となり、波状の多層構造を呈した。W-KO マウスでは、エナメル質の幅が WT マウスや Sox21-KO マウスと比較して減少し、AMBN-KO マウスと比較して増加した。また、エナメル芽細胞は細胞極性が失い小さい細胞となり多層構造を呈した。根尖部領域にて、エナメル芽細胞は細胞極性を有し細長い細胞となり、規則的な単層構造を呈した。

各マウスにおけるエナメル質の形成不全の状態を精査するために、SEM により結晶構造や成分を解析した。質量比で元素分析を行った場合、AMBN-KO マウスでは、WT マウスと比較すると、有機物の含有率は減少し、無機物の含有率が増加した。これは、AMBN 欠損により未分化な分泌期のエナメル芽細胞の活性が低下したことによると考えられる。分泌期のエナメル芽細胞の活性が低下したため、エナメルマトリクスの分泌が減少し、無機物は勿論、有機物の含有量も減少したためと推測できる。そして、その後の成熟期のエナメル芽細胞の活性には問題がなく、エナメル質の石灰化は通常通り行われたため、有機物や水分は脱却された。このため、全体のマトリクスは減少したがその内のカルシウムやリンなどの無機物の含有率に関しては相対的に増加したと推測される。Sox21-KO マウスでは、WT マウスと比較すると、有機物の含有率は増加し、無機物の含有率は減少した。これは、Sox21 欠損により AMBN-KO マウスとは対照的に、分泌期のエナメル芽細胞の活性には問題がなくエナメルマトリクスの分泌は通常通り行われたが、成熟期のエナメル芽細胞の活性が低下しエナメル質の石灰化に影響が生じ有機物や水分が十分に脱却できなかったためと考えられる。このため、酸素や炭素などの有機物の含有率は増加し、またエナメルマトリクス全体の量が増加したため相対的に無機物の含有率は減少したと推測される。AMBN と Sox21 を両方欠損させた W-KO マウスでは、AMBN 欠損により、分泌期のエナメル芽細胞の活性が低下しエナメルマトリクスの分泌が減少し、酸素や炭素などの有機物やカルシウムやリンなどの無機物の含有量が減少した。更に Sox21 欠損により、成熟期のエナメル芽細胞の活性が低下し、エナメル質の石灰化に影響が生じ有機物が十分に脱却されなかった。その

ため、Sox21-KO マウスと比較すると酸素や炭素などの有機物の含有率が相対的に増加し、AMB-N-KO マウスと比較するとカルシウムやリンなどの無機物の含有率が相対的に減少したと推測される。

各マウスの組織学的な解析のため、H-E 染色を行った。AMB-N-KO マウスでは、エナメル芽細胞の細胞極性の消失や多層構造、エナメル質の菲薄化などが認められた。これは、AMB-N 欠損により分泌期のエナメル芽細胞の活性が低下し、エナメルマトリクスの分泌が減少したためと考察できる。Sox21-KO マウスでは、エナメル芽細胞は細胞極性の消失や多層構造を呈したがエナメル質の厚みに変化は認められなかった。以上のことから Sox21 欠損により、未分化な分泌期のエナメル芽細胞ではなく、より分化した成熟期のエナメル芽細胞の活性が低下し、エナメル質の石灰化が阻害されたのではと推測される。W-KO マウスでは、エナメル芽細胞の細胞極性の消失や多層構造、エナメル質の菲薄化が認められた。また AMB-N-KO マウスと比較するとエナメル質の厚みが増加した。これは AMB-N 欠損により、分泌期のエナメル芽細胞の活性が低下しエナメルマトリクスの分泌が減少し、更に Sox21 欠損により、成熟期のエナメル芽細胞の活性が低下しエナメル質の石灰化が阻害されたためではないかと考察できる。AMB-N と Sox21 の相互関係がどの分化段階でどのようにエナメル芽細胞の機能に影響を及ぼし、エナメル質の形成・成熟に関与するかは今後詳細な解析の必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----