

機関番号：32622

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～2010

課題番号：20592235

研究課題名 (和文)

生体組織におけるアメロジェニン遺伝子発現様式への検討

研究課題名 (英文)

Examination to an amelogenin gene expression in several tissues in a body

研究代表者

山田 嘉重 (YAMADA YOSHISHIGE)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：40360127

研究成果の概要 (和文)：

本研究ではマウスの様々な臓器の組織においてアメロジェニン遺伝子が発現するかを検討した。臓器の試料は胎生 9 日、18 日齢および生後 8 週齢の臓器から得られた cDNA に対してアメロジェニン遺伝子発現の有無を検討した。標的とする組織は歯および歯関連組織を含まない 16 種の組織 (脳、心臓、肺、肝臓、胃、腎臓、膵臓、脾臓、小腸、大腸、筋、皮膚、精巣、卵巣、子宮、胎盤) より抽出したトータル mRNA から得られた 1 strand cDNA を作製し使用した。胎生 9 日、18 日齢のものは上記 cDNA の混合を使用し、生後 8 週齢のものは各組織の cDNA を使用した。得られた cDNA に対しては、アメロジェニンエクソン 6 の一部から 7 に対応する増幅サイズ 226bp のプライマーを作製し PCR を施行した。PCR の結果、胎生 18 日齢、生後 8 週齢のマウスからはアメロジェニン遺伝子発現が確認されたが、胎生 9 日齢のマウス組織より得られた cDNA からはアメロジェニンの遺伝子発現は確認されなかった。生後 8 週齢の組織から得られた cDNA に対する PCR の結果では胃と膵臓以外の 14 種類の組織よりアメロジェニン遺伝子の発現が認められた。得られた結果よりアメロジェニン遺伝子は歯以外の組織にも存在すること、またその発現が初期の発育時期のみならず、ある程度成熟した時期においても行われていることが確認された。従ってアメロジェニンは歯以外の様々な組織の恒常性にも関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The gene expression of amelogenin in several mouse tissues were evaluated in this study. The samples were chosen from embryonic 9day, 18day mouse tissue mix cDNA, 8week mouse tissues mix cDNA and several each target tissues cDNA. The target tissues for this study were selected 16 tissues (brain, heart, lung, liver, stomach, uterus, placenta, kidney, pancreas, testine, muscle, skin, small intestine, large intestine, spleen, and ovary) from 8week old mouse body. The polymerase chain reaction(PCR) was used to amplify several size of amelogenin using a part of exon6 to exon7 (small size of PCR amplification :226bp). The result of PCR amplification showed the positive react of gene expression at 8week mouse tissues mix cDNA and 18day mouse tissue mix cDNA. However none of gene expression was detected by embryonic 9 day mouse tissues mix cDNA. The result of the PCR amplification for 16tissues was obtained amelogenin gene expression in 14 tissues excluded stomach and pancreas. These results suggested that amelogenin genes are expressed in various tissues and this expression is not only restricted to development stage that also expressed in adult mouse. These results suggested that amelogenin might play some homeostatic role in various tissues of the body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,800,000

研究分野：歯内治療学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：アメロジェニン、免疫組織染色、ラット切歯、マウス胎児

1. 研究開始当初の背景

エナメル質を構成するアメロジェニン遺伝子は歯の形成過程の上皮-間葉系組織の相互作用に関与していると考えられている。また近年口腔組織だけではなく、歯以外の組織においてもアメロジェニンの発現が報告されており、歯の形成以外にもアメロジェニンが関与している可能性が強く示唆されている。しかしその働きは明らかでなく、それに関する考察も充分になされていない。

2. 研究の目的

本研究では、各組織におけるアメロジェニン遺伝子の発現を PCR 法、in situ PCR 法等を用いて明確にすることである。またさまざまな週齢のマウスにおけるアメロジェニン遺伝子の発現状態を観察することで、発現時期の違いにより歯および各臓器においてアメロジェニンがどのように関与しているかを推察・検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

アメロジェニンの各エクソンサイズの遺伝子に相当するプライマーを本研究に使用した。エクソン4から7(4F-7R)、エクソン5から7(5F-7R) 3種類のエクソン6から7まで(6C4F-7R、6C6F-7R、6D2F-7R)の計5種類のプライマーを設計・準備した。各増幅サイズは4F-7Rが677 bp、5F-7Rが635 bp、6C4F-7Rが268 bp、6C6F-7Rが266 bp、6D2F-7Rが226 bpになるように設計した。アメロジェニンのトータル cDNA (Amex47) 用いた PCR の結果では、5種類全てのプライマーにて遺伝子サイズ相当の遺伝子の増幅産物が確認された。この結果より作製した5種類全てのプライマーにてアメロジェニン遺伝子の PCR 増幅が可能なことが確認された。マウス混合組織から得られた cDNA を用いた PCR 遺伝子増幅においても全てのプライマーにて推定増幅サイズ相当のアメロジェニン遺伝子の存在が観察された。しかし、最も DNA のサイズの小さい 6D2F と 7R のプライマーセットを用いた増幅のみ最も明確な単一のバンドが認められた。そのため本研究ではサイズの最も小さい 6D2F-7R(226BP) を採用した。歯に関連する組織以外の組織由来のアメロジェニン遺伝子の発現を確認する目的で生後 8 週齢マウスの歯および歯関連組織を含まない 16 種の組織(脳、心臓、肺、肝臓、胃、腎臓、膵臓、脾臓、小腸、大腸、筋、皮膚、精巣、卵巣、子宮、胎盤)より抽出した mRNA から得られた 1 strand cDNA を準備した。上記実験にて PCR 増幅

が可能なことが確認されたプライマー 6D2F と 7R のセットを用いてアメロジェニン遺伝子の発現の有無を熱変性 94 °C・1分、アニーリング 55 °C・1分、伸長反応 72 °C・1分を 40 サイクルの PCR 条件下にて施行し、2%アガロースゲルにて電気泳動を行い遺伝子増幅の可否を検討した。

4. 研究成果

マウス胎生 9 日齢、18 日齢混合組織に対するアメロジェニンの発現では、18 日齢の試料からはアメロジェニン遺伝子増幅は確認されたが、9 日齢の試料からは遺伝子発現は確認できなかった。16 種類の各臓器におけるアメロジェニン遺伝子の PCR 増幅は前記実験にて良好な PCR 増幅が得られた 6D2F-7R の PCR 増幅産物にて検討した。PCR の結果より胃と膵臓以外の腎臓、肝臓、筋など 14 種類の組織にてアメロジェニン遺伝子の発現が確認された。

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 3 件)

1. 山田嘉重、増田宜子、マウスにおけるアメロジェニン遺伝子発現の検討—PCR 法による基礎的解析—。ACBTE, 14:6—12, 2010
2. Masuda MY, Wang X, Yokose S, Yamada Y, Kimura Y, Okano T, Matsumoto K: Effect of glipican-1 gene on the pulp cells during the reparative dentine process. Cell Biol Int 34 1069-1074, 2010
3. Masuda MY, Kobayashi M, Wang X, Yamada Y, Kimura Y, Hossain M, Matsumoto K: Effect of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. Acta Histochem, 112 452-458, 2010

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 山田嘉重、増田宜子。ラットにおけるアメロジェニン遺伝子の発現様式への検討—PCR—による基礎的解析第 13 回エナメル質比較発生学懇話会 7 月 10、11 日、山中湖、山梨 2010 年
2. 増田宜子、山田嘉重、宮本洋一、上條竜太郎。レーザー照射血管内皮細胞がラット培養歯髄細胞へ与える影響について。第 133 回日本歯科保存学会、10 月 28、29 日。岐阜、平成 22 年

3. Masuda Y, Yamada Y Effect of laser irradiated endothelial cells on dental pulp cells. 88th IADR July14th-17th, Spain, 2010
4. 山田嘉重。プロメライン酵素とオレンジオイルを併用した齶蝕除去剤の開発の検討。第48回日本小児歯科学会 5月19、20日、名古屋
5. 山田嘉重、増田宜子、川中岳雄、真鍋厚史、久光久、藤島昭宏、宮崎隆。プロメライン酵素とオレンジオイルの併用による齶蝕除去歯面に対する接着性の評価。第132回日本歯科保存学会、6月4、5日。熊本、平成22年
6. 川中岳雄、山田嘉重、増田宜子、玉置幸道、宮崎隆。レーザー照射と次亜塩素酸ナトリウムの組み合わせによる塩素ガス発生への検討(第2報)第132回日本歯科保存学会、6月4、5日。熊本、平成22年
7. 山田嘉重、仲田泰治、増田宜子、那須裕弥、清水由子、玉置幸道、藤島昭宏。オレンジオイルと果実酵素を併用した齶蝕除去剤の開発。第131回日本歯科保存学会 平成21年10月29、30日、仙台
8. 増田宜子、山田嘉重。レーザー照射血管内皮細胞がラット培養歯髄細胞へ与える影響について。第131回日本歯科保存学会 平成21年10月29、30日、仙台
9. 川中岳雄、山田嘉重、木下潤一朗、大場崇史。レーザー照射と次亜塩素酸ナトリウムの組み合わせによる塩素ガス発生への検討。第130回日本歯科保存学会 平成21年6月11、12日 札幌
10. 山田嘉重、真鍋厚史、増田宜子、那須裕弥、清水由子、久光久、松本光吉。カリソルブ処置後の接着性に対する再評価。第129回日本歯科保存学会 平成20年11月 富山
11. 山田嘉重、真鍋厚史、増田宜子、那須裕弥、清水由子、久光久、松本光吉。Carisolv®使用の問題点に関する検討。(臨床セッション)第129回日本歯科保存学会 平成20年11月 富山
12. 小林未歩、増田宜子、山田嘉重、松本光吉。MTAによる培養ラット歯髄細胞の象牙芽細胞文化に及ぼす影響。第129回日本歯科保存学会 平成20年11月 富山
13. 増田宜子、山田嘉重、小林未歩、松本光吉。ラット培養歯髄細胞におけるHSPG(grp-1,2,3,4)の発現について。第129回日本歯科保存学会 平成20年11月 富山
14. 山田嘉重、増田宜子、川中岳雄、松本光吉。外傷受傷歯の清掃に対する検討—人工的破折歯を用いた基礎的研究—。

第8回日本外傷歯学会 平成20年11月1-3日 沖縄

〔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

山田 嘉重 (YAMADA YOSHISHIGE)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号：40360127

(2) 研究分担者

増田 宜子 (MASUDA YOSHIKO)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号：10297038
川中 岳雄 (KAWANAKA TAKEO)
昭和大学歯学部・助教
研究者番号：10365702

(3) 連携研究者

()

研究者番号：