

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年1月31日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890117

研究課題名（和文）

歯胚発生におけるHox遺伝子の発現パターンと機能解析

研究課題名（英文）

Expression and function analysis of Hox genes in tooth development

研究代表者

内部 健太 (UCHIBE KENTA)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：20584618

研究成果の概要（和文）：

これまで歯胚発生との関連が報告されていない Hox 遺伝子群に注目し，in situ hybridization 法による，歯胚での包括的な発現パターン解析を行った。その結果，計 9 種の Hox 遺伝子が歯胚発生過程において，部位特異的な発現パターンを示す事が明らかとなり，歯胚発生において機能を担っている事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We focused on Hox genes, which have never been reported to be included in tooth development. The expression patterns of Hox genes in developing tooth germ were determined by in situ hybridization assays. As a result, 9 of 32 analyzed genes showed spatial specific expression patterns in developing tooth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,160,000	348,000	1,508,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,250,000	675,000	2,925,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯胚，発生，Hox

1. 研究開始当初の背景

歯の再生研究は，マウスを代表とする実験動物では著しい進展を遂げ，ヒトへの応用に期待が持たれている。その手法は，上皮細胞と間葉細胞を生体内の位置関係を再現するように生体外で再構成するものを中心とし，Ohazamaらはマウス歯胚上皮とマウス骨髄間質細胞などの間葉系細胞を再構成し，エナメル質，象牙質，ならびに歯髄様組織の再生に成

功した。更に，Nakaoらは，胎生期マウス歯胚組織から分離した上皮細胞と間葉細胞を用いて，非常に高い成功率で再生歯の作製に成功した。しかしながら，これらのいずれの報告においても，歯の大きさや形態，とりわけ臨床において重要な意味を持つ歯冠形態のコントロールに成功した例は無く，将来的な臨床応用に向けては今後解決すべき大きな課題として残されている。

この課題を解決するためには、歯の発生メカニズムを解明することが重要である。歯は、胎生期の第一鰓弓上皮と神経堤由来間葉組織に由来し、この両者の相互作用により発生が進行する。その発生機序は、シグナル分子や転写因子をはじめとした、非常に多くの分子によって緻密に制御されていることがこれまでの研究から明らかにされている。特に転写因子は発生に関与する標的遺伝子の転写を活性化あるいは抑制することで細胞の運命決定を行うマスター遺伝子として働くことから、特に重要な遺伝子群として知られている。

個体発生において、前後軸の特異性の決定を行う転写因子として *Hox* 遺伝子が知られている。この遺伝子群は胎生期において、前後軸に沿って発現している遺伝子の組み合わせが異なり、これにより体軸形成がなされるという、“*Hox* コード”を形成している。*Hox* 遺伝子は哺乳類においては染色体重複により複数のクラスターを持って存在しており、いくつかのノックアウトマウスの表現型から哺乳類においても前後軸の特異性の決定に深く関与していることが明らかとなっている。一方で、近年これらの遺伝子は四肢や毛胞の発生など前後軸形成以外の役割を担っていることも分かっている。

Hox 遺伝子はパターンニングを司る遺伝子として認識されてきたが、個々の器官発生における機能はいまだ不明な点が多く、現在においても解析の余地を大きく残している。歯胚発生においても、これまで *Hox* 遺伝子の機能は明らかにされていない。毛胞発生での重要な機能が明らかとなっていることを考えると、初期発生での共通点を多く持つ歯胚においても *Hox* 遺伝子が何らかの機能を有していることが推測される。

これまでに *Hox* 遺伝子の歯胚発生における解析を行った報告はほとんど無く、ヒト歯胚における発現レベルのPCR解析が行われている程度である。歯胚発生における *Hox* 遺伝子群の役割が明らかとなれば、歯胚と同じく上皮間葉相互作用を経て発生する臓器を中心として、器官発生研究に大きなインパクトを与えることは間違いない。

2. 研究の目的

Hox 遺伝子の歯胚発生における発現パターンを、複数の発生ステージに渡って解析することで、歯の発生と *Hox* 遺伝子の関係を検討すること。また、その機能を解析すること。

3. 研究の方法

Hox 遺伝子群の歯胚における発現を、*in*

situ hybridization 法を用いて、組織学的手法により解析した。対象はマウス下顎第一臼歯歯胚とし、解析に用いた発生ステージは胎生 (E) 13.5, 14.5, 18.5 日とした。これらの発生ステージは、それぞれ、蕾状期、帽状期、鐘状期に相当するものである。

(1) マウス歯胚組織切片の作製

- ① 妊娠マウスから E13.5, 14.5, 18.5 の 3 ステージで胎仔を摘出した。
- ② 胎仔全体 (E13.5, E14.5) もしくは頭部のみ (E18.5) をパラフィン包埋した。
- ③ パラフィンブロックからマイクロトームを用いて下顎第一臼歯を含む、厚さ 7 μ m の前頭断組織切片を作製した。

(2) RNA プローブの作製

各遺伝子の cDNA を鋳型としてジゴキシゲニン (digoxigenin; DIG) 標識した RNA プローブを作製した。

(3) *in situ* hybridization 法による発現解析

- ① 全 39 種の *Hox* 遺伝子のうち、今回 RNA プローブ作製用テンプレートが入手可能であった 32 因子について解析を行った。
- ② 準備した組織切片と RNA プローブを用いて、通法に従い *in situ* hybridization を行った。すなわち、各 RNA プローブを 65°C で 16 時間ハイブリダイズさせ、NBT/BCIP 溶液でシグナルの可視化を行った。発色反応に関しては、バックグラウンド発色が生じる直前まで行い、最大限発色させるよう検鏡しながら反応時間を決定した。なお、すべての作業は RNase free 環境下で実施した。
- ③ 得られた染色像を光学顕微鏡下で観察し、検討を加えた。

4. 研究成果

全 39 種の *Hox* 遺伝子のうち、*Hoxa3*, *Hoxb2/3/9*, *Hoxc11*, *Hoxd8/11* 以外の計 32 因子について、*in situ* hybridization を行った。発生ステージについては、初期の歯胚発生における発現パターンを確認できる E13.5 歯胚 (蕾状期)、歯胚発生過程において最もダイナミックな形態変化が生じるステージであり、非常に多くの遺伝子により制御されていることが推測される E14.5 (帽状期)、エナメル芽細胞や象牙芽細胞といった分化細胞が出現し、これら細胞での発現が確認できる E18.5 歯胚 (鐘状期) の 3 ステージでの検討を行った。

この結果、今回検討を行った全 *Hox* 遺伝子 32 因子のうち、9 因子について歯胚での発現を検出することができた。具体的には、*Hoxa7/9/11*, *Hoxb6/7*, *Hoxc4/12*, *Hoxd9/12* について、いずれかのステージで歯胚に発現している事が確認できた。また、残りの 23 因子は、今回の実験でその発現を歯胚で検出することはできなかったが、例えば *Hoxb8* はすでに報告されている通り、脊椎背側での発現を同様に検出できており、今回の実験結果の信頼性を示す一つの指標となった。

以下に、今回歯胚での発現が確認された各因子に関して、発現部位とステージをまとめる (図)。

(1) *Hoxa7*

E14.5 の歯胚上皮、間葉それぞれにおいて発現を認め、E18.5 においても上皮由来のエナメル芽細胞および間葉由来の象牙芽細胞に強く発現が認められた。

(2) *Hoxa9*

E18.5 のエナメル芽細胞に弱い発現を検出された。

(3) *Hoxa11*

E14.5 歯胚上皮に発現が認められた。

(4) *Hoxb6*

いずれの発生ステージにおいても、上皮、間葉双方に強く発現が検出された。

(5) *Hoxb7*

E14.5, 18.5 の上皮ならびに間葉にその発現が認められた。

(6) *Hoxc4*

すべてのステージで上皮、間葉ともにその発現が認められた。E18.5 では、外エナメル上皮にも発現していた。

(7) *Hoxc12*

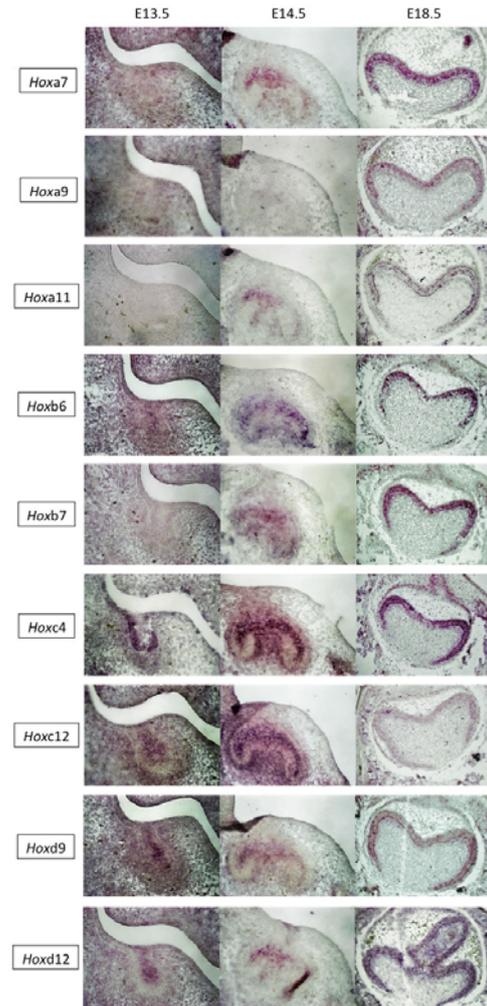
E13.5, 14.5 では上皮、間葉双方に強く発現が認められたが、E18.5 では発現を検出することはできなかった。

(8) *Hoxd9*

全てのステージにわたって、歯胚上皮に発現が検出された。

(9) *Hoxd12*

すべてのステージにおいて上皮および間葉にその発現が認められた。



今回発現が確認できたこれら 9 因子の全てが歯胚上皮で発現していたが、*Hoxb6/7*, *Hoxc4/12* などは歯胚間葉でも発現を認めた。また、*Hoxa11* のように、発生が進むとこれまで検出されていたシグナルが検出されなくなるものもあった。これらの遺伝子は、いずれもこれまで歯胚での発現の報告は無く、歯の発生機序に関与する可能性のある、新たな因子を発見することができた。しかし、これらの因子が歯胚発生において、どのような役割を担っているのかは不明である。

今回歯胚で発現が確認されたもののうち、*Hoxa7*, *Hoxb7* を例に挙げると、いずれの因子も既にノックアウトマウスが報告されているおり、後者に骨格のフェノタイプが報告されているものの、前者はフェノタイプが無いと報告されている。しかし、これらのダブルミュータントではフェノタイプが増強されることから、これらパラログ因子は相互に機能を補い合っている可能性がある。今回の結果から、歯胚においても両因子は非常に似通った発現パターンを示しており、一定の機能を共有しているものと推測される。

今後はこれらの因子について、歯胚発生における機能の解析を進めていく必要がある。具体的には、loss of function, gain of function の検討を行い、*Hox* 遺伝子が正常な歯の発生に必須の因子であるか否かを検討する必要がある。また、今回の結果は歯胚発生に限らず、*Hox* 遺伝子群が初期胚発生における軸形成に加えて、各器官の発生に大きく関与していることを再確認するものであった。すなわち、今後 *Hox* 遺伝子の解析を行う上で、歯胚発生がひとつの有用なモデルになり得ると考えられる。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内部 健太 (UCHIBE KENTA)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：20584618

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者