

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861676

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 pattern and functional analysis of Hox genes in the tooth germ development

研究代表者

新川 重彦(Shinkawa, Shigehiko)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：10727465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、いまだ全貌が明らかとなっていない歯の発生メカニズムを、Hox遺伝子に着目し、歯胚発生への関わりを解明することを目的とした。胎生13,14,18日齢のマウス下顎第一臼歯歯胚において、13のHox遺伝子が発現しており、その中でも歯の発生のキーレギュレーターであるShhとの関連が疑われるHoxd12に注目し研究を行った。

ラット歯原性上皮細胞を用い、Hoxd12遺伝子と、エナメル芽細胞分化マーカーであるAmbnおよびShhとの関連を検討したところ、Hoxd12遺伝子の発現に関連して両遺伝子の発現量が変化しており、Hoxd12の発現がShh、Ambnの発現に関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As for the mechanism of tooth development, the total picture does not yet become clear. A purpose of this study is to elucidate a relation to the dental germ outbreak of the Hox gene. 13 Hox genes emerge in the mandibular first molar dental germ of the mouse of the age on viviparous 13,14,18 day. We paid attention to Hoxd12 that connection with Shh which was a key regulator to development of tooth is doubted. With a rat odontogenic epithelium cell, I examined an association between Hoxd12 gene and Ambn and Shh which was an ameloblast differentiation marker. When Hoxd12 gene emerges, the expression of both genes changes. The possibility that expression of Hoxd12 was related to expression of Shh, Ambn was suggested.

研究分野：歯の発生

キーワード：歯胚発生 Hox遺伝子群

### 1. 研究開始当初の背景

歯胚発生は、胎生期における第一鰓弓上皮と神経堤由来間葉組織の相互作用によって進行する。この上皮-間葉相互作用についてはこれまでに多くの研究がなされており、その過程においては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する転写因子が重要な役割を担っていることが知られている。

申請者の研究グループはこれまでに、国立成育医療研究センター研究所との共同研究のもと、発生期歯胚に発現する新規転写関連遺伝子の探索を行ってきた。その結果、既知の転写因子に加えて、これまでに歯胚で発現の報告が無い 28 因子を新規に同定することに成功した。そして、大変興味深いことに、28 因子の中に、個体発生において、前後軸の特異性の決定を行う Hox 遺伝子が 2 因子含まれていた。

Hox 遺伝子は、胎生期において、頭尾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嚢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。しかし、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が、毛嚢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は想像に難くない。そこで、申請者は Hox 遺伝子に注目し、全 39Hox 遺伝子の歯胚発生における発現パターンを詳細に検討するため、胎生 13,14,18 日齢の歯胚を用い、in situ hybridization を行った。その結果、13 の Hox 遺伝子が発生期歯胚において部位特異的な発現パターンを示すことを明らかにした。この結果からも、Hox 遺伝子の幾つかは歯胚発生において何かしらの役割を担っていることが強く推測される。

### 2. 研究の目的

本申請研究では、いまだ全貌が明らかとなっていない歯の発生メカニズムを、発生期歯胚において部位特異的に発現する Hox 遺伝子、中でも肢芽由来細胞において、歯胚発生のキーレギュレーターである Shh の発現を誘導することが報告されている Hoxd12 遺伝子に注目し、歯胚発生における Hox 遺伝子の機能を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ラット歯原性細胞の培養

rSF2s はラット切歯のサービカルループから分離した細胞から上皮細胞のみを分離し、不死化した細胞であり、エナメル芽細胞の分化マーカーである Amelogenin (Amelx)、Ambn および上皮細胞のマーカーである Cytokeratin 14 (CK14) を発現している細胞である。

これらの細胞を 10%ウシ胎仔血清 (FBS; Invitrogen), 1% penicillin (SIGMA), 100 mg/ml streptomycin (SIGMA) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM/F-12; Invitrogen) 培地を用いて  $7.5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 気相下で培養を行った。そして 24 時間後に 3%FBS 含有 D-MEM/F-12 培地に交換した。rSF2s がサブコンフルエントに達した時点でヒトリコンビナント Bone Morphogenetic Protein (hBMP) 4 (R&D) を 100 ng/ml の濃度で添加し、2 日間培養を行なった。

#### (2) 定量性 RT-PCR

遺伝子発現プロファイルは定量性 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にて解析した。つまり、各条件下で培養した細胞から RNeasy (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。1 µg の total RNA を iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) を用いて逆転写反応を行い cDNA を得た。増幅反応には iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を使用し、Chromo4 (Bio-Rad) を用いて定量的解析を行った。内部標準として S29 遺伝子を用いた。各サンプルの S29 mRNA の増幅産物量に対する目的 mRNA の増幅産物量の相対比を求め、遺伝子発現量の変化を評価した。

#### (3) 遺伝子発現抑制モデル

遺伝子抑制実験には、MISSION® siRNA (SIGMA) を使用した。つまり、ラット Hoxd12 (rHoxd12) MISSION® siRNA (siHoxd12) を 25 nM の濃度で Lipofectamine RNAi MAX (Life technologies) を用い、プロトコルに従い、rSF2s に遺伝子導入した。また対照群として、MISSION siRNA Universal Negative Control (siCont; SIGMA) を同様の濃度で使用した。遺伝子導入 48 時間後に細胞を回収した。

#### (4) 遺伝子過剰発現モデル

rHoxd12 の過剰発現ベクターを作製するため、rSF2s から得た cDNA を鋳型とし、Hoxd12 遺伝子特異的プライマーの 5' 末端および 3' 末端にそれぞれ Sgf1, Pme1 の制限酵素サイトを付与した DNA プライマーを用いて、増幅を行った。得られた PCR 産物および pFN21A expression vector (Promega) を Sgf1, Pme1 制限酵素を用いダイジェッションを行い、精製後それらをライゲーションした。次に、E. coli HST08 Premium Competent Cells (Takara) に作製した発現ベクターを用い、形質転換を行い、アンピシリン含有 LB 培地

( invitrogen ) で培養した . 16 時間後に大腸菌を回収し , Wizard® Plus SV Minipreps ( Promega ) を用い , プラスミドを精製した . 作製した Hoxd12 発現ベクターをエレクトロポレーション法にて rSF2s に 100 µg/ml の濃度で導入を行ない , 48 時間後に細胞を回収した . 対照として , GFP 発現ベクターを同様の方法で遺伝子導入した .

#### ( 5 ) 統計解析

実験データの統計学的解析には unpaired-t test を用いた .

#### 4 . 研究成果

歯胚発生初期において発現する BMP4 は , 歯の発生において重要な働きを担っている Shh の発現を制御することが知られている . そこでラット歯原上皮組織由来細胞である rSF2s を BMP4 にて刺激し , 遺伝子発現量の変化を定量性 RT-PCR 法にて検討した . その結果 , Shh および歯原性上皮の分化マーカーの一つである Ambn の遺伝子発現量はそれぞれ約 1.7 倍および 4 倍に上昇し , その発現量は有意に促進された . また , 興味深いことに Hoxd12 の遺伝子発現量も BMP4 刺激により約 2.5 倍促進された .

次いで , Hoxd12 遺伝子の歯原性上皮の分化への関与を確認するため , Hoxd12 の siRNA を rSF2s に遺伝子導入しマーカー遺伝子の発現量を定量性 RT-PCR 法にて検討した . その結果 , Hoxd12 の遺伝子発現量は約 30% に抑制され , Shh および Ambn の遺伝子発現量はそれぞれ約 25% および 20% に抑制された . さらに Hoxd12 の強制発現ベクターを rSF2s に遺伝子導入した . その結果 , Hoxd12 の遺伝子発現量は約 3 倍に促進され , Shh および Ambn の遺伝子発現量はそれぞれ約 3.2 倍および 3.8 倍に促進された .

Shh は , 生体内の多数の組織において , 形態形成に非常に重要な役割を果たしている . 歯胚においても , 上皮組織に発生初期からその発現を認め , 多くのシグナル経路に影響を与える事で , 中心的な役割を担っている . 近年の報告によると , エナメル芽細胞分化においても Shh シグナリングが重要であることが示されており , 初期形態形成から細胞分化に至るまでを制御するキーレギュレーターとして認識されている . 今回注目して実験を行った Hoxd12 は枝芽由来細胞において Shh の発現を誘導することが報告されている . また同じ報告において , Shh はそのプロモーター領域に Hoxd12 結合配列を有しており , 実際に Hoxd12 が結合することが示されている . これらの事から , 本研究においても Hoxd12 に着目し , Shh ならびにエナメル芽細胞分化マーカーである Ambn との関係性を検討した . その結果 , Hoxd12 遺伝子の強制発現によって Shh , Ambn とともに発現量の上昇 , さらに siRNA を用いた Hoxd12 発現抑制によって両者ともに発現量の減少が確認された . これらの結果は , ラット歯原性上皮組織由来細胞において

Shh および Ambn は Hoxd12 によってその発現が制御されていることを示唆している . しかしこの制御機構が , 先に報告されているような Hoxd12 の結合による直接的なものであるのか , あるいは間接的な作用であるのかは本申請研究では明らかにすることは出来なかった . 実際 , In vivo , あるいは ex vivo の実験を計画し , 遺伝子導入による表現形の差をいくつかの方法で検討したが , そのいずれにおいても安定した結果を得ることが出来なかった .

今後の展望として , 発生期歯胚における影響を生体内あるいは器官培養系などにおいて評価していく必要があると思われる .

#### 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 1 件 )

Nakajima R, Ono M, Hara ES, Oida Y, Shinkawa S, Pham HT, Akiyama K, Sonoyama W, Maekawa K, Kuboki T

「 Mesenchymal stem/progenitor cell isolation from tooth extraction sockets. 」  
Journal of Dental Research, 査読あり , 93 巻 11 号 , 2014 , 1133-1140

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

大野充昭 , 大島正充 , 園山亘 , 小川美帆 , 笈田育尚 , Hara ES , 新川重彦 , 中島 隆 , 辻 孝 , 窪木拓男

「 出生後のイヌ永久歯歯胚組織を用いた器官原基法による完全な臓器としての歯の発生 」

公益社団法人日本補綴歯科学会第 123 回学術大会 2014 年 5 月 24 日 , 仙台

新川重彦 , 内部健太 , 大野充昭 , 園山亘 , Hara ES Emilio , 吉岡裕也 , 植田淳二 , 窪木拓男

「 マウス歯胚発生過程における Hox 遺伝子の発現パターン 」

公益社団法人日本補綴歯科学会第 123 回学術大会 2014 年 5 月 24 日 , 仙台

新川重彦 , 内部健太 , 大野充昭 , 園山亘 , Hara ES , 吉岡裕也 , 植田淳二 , 窪木拓男 , 浅原弘嗣

「 マウス歯胚発生過程における Hox 遺伝子の発現パターン 」

第 3 回補綴若手研究会 2014 年 3 月 1 日 , 雲仙

[ 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

新川 重彦 (SHINKAWA, Shigehiko)

岡山大学病院・医員

研究者番号：10727465

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：