

氏名	新川 重彦
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4846号
学位授与の日付	平成25年9月30日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	マウス歯胚発生過程における Hox 遺伝子の発現パターン
学位論文審査委員	山本 敏男 教授 滝川 正春 教授 窪木 拓男 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

転写因子は、標的遺伝子の発現を制御することで、多くの器官発生において中心的かつ多彩な役割を担うことが知られている。歯胚発生においても数多くの転写因子が関与していることがヒトやマウスを用いた研究により報告されている。

Hox 遺伝子群は、DNA 結合領域としてホメオドメインを有する転写因子であり、マウスやヒトにおいては 39 因子より構成される。これらは胎生期において体軸のパターン形成に関わる重要な転写因子であることが知られているが、近年これらの遺伝子が個別の器官形成においても機能することが明らかとなっていった。歯胚発生における *Hox* 遺伝子の関与については現在まで報告が少なく、未だ明らかとされていない。しかし、腎臓や毛包といった歯胚と初期発生機序の似通った器官での報告が為されており、歯の形成過程においても *Hox* 遺伝子が関与している可能性は非常に高いと考えられる。

これらの背景から本研究では歯胚発生と *Hox* 遺伝子の関係を検討することを目的にマウス歯胚における *Hox* 遺伝子の発現パターン解析を、全 39 因子について行った。さらに歯胚において発現を検出した遺伝子の中から、*Hoxd12* に注目し、歯胚発生の主要制御因子として知られている *Shh* およびエナメル芽細胞分化マーカーのひとつである *Ambn* との関係をラット歯原性上皮細胞株 (rSF2s) を用いて検討した。

【材料および方法】

すべての動物実験および細胞実験は、岡山大学動物実験委員会の承認 (OKU-2012338) のもとで行った。

1. マウスおよび組織切片作製：ICR 系妊娠マウスを、妊娠 13.5, 14.5, 18.5 日において頸椎脱臼により屠殺後開腹し、胎仔を採取した。採取した胎仔サンプルを通法にしたがってパラフィン包埋し、厚さ 7 μm の前頭断切片を作製した。
2. *in situ* ハイブリダイゼーション：*Hox* 遺伝子群の歯胚における発現の検証には、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた。実験にはジゴキシンゲンでラベルした RNA プローブを用いた。
3. ラット歯原性細胞の培養、遺伝子発現解析：rSF2s を用いて、BMP4 が *Hoxd12*, *Shh* および *Ambn* に与える影響について、遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法を用いて検討した。また、*Hoxd12* の *Shh* および *Ambn* に与える影響を検討するため、siRNA を用いた *Hoxd12* 遺伝子の発現抑制および遺伝子発現ベクターを用いた *Hoxd12* 遺伝子強制発現下において、それぞれの遺伝子発現を定量性 RT-PCR 法を用いて検討した。
4. 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。

【結果と考察】

1. *Hox* 遺伝子のマウス歯胚における発現の検証: 胎生 13.5 日齢の歯胚では, *Hoxa3*, *b2*, *b3*, *b6*, *c4*, *c11*, *c12*, *d9*, *d12* の 9 つの因子が上皮組織において観察された。胎生 14.5 日齢の歯胚では *Hoxa3*, *a7*, *a11*, *b2*, *b3*, *b6*, *b7*, *c11*, *d9*, *d12* の 10 因子が上皮組織において観察され, *Hoxb6*, *b7*, *c4*, *c12* は上皮, 間葉両方で観察された。胎生 18.5 日齢の歯胚では *Hoxa3*, *a7*, *a9*, *a11*, *b2*, *b3*, *c4*, *c11*, *c12*, *d9*, *d12* の 11 因子が上皮組織においてのみ観察され, *Hoxb6*, *b7* については象牙芽細胞においてもわずかに発現が認められた。
2. *Hox* 遺伝子がラット上皮細胞の分化に与える影響の検証: rSF2s を BMP4 にて刺激したところ, *Shh* および *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, *Hoxd12* の遺伝子発現量も BMP4 刺激により約 2.5 倍に促進された。次いで, *Hoxd12* の siRNA を rSF2s に遺伝子導入したところ, *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, それぞれの遺伝子発現量を解析したところ, *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。

本研究は, 特に歯冠形成に重要な 3 ステージでの発現パターンを, 全 39 因子について包括的検討を行なった。すなわちこれらの中には, 歯胚での発現パターンが初めて示されたものが多く, *Hox* 遺伝子が歯胚発生に関与している可能性を示す結果を得ることが出来た。また, 今回歯胚での発現が確認された *Hox* 遺伝子は, その多くが上皮組織において観察され, 過去の報告と一致すると同時に, 毛胞発生過程においても多くの *Hox* 遺伝子が上皮組織で発現する事とも同様の結果であり, 歯の形成においても, *Hox* 遺伝子は主に上皮において機能することが示唆された。

Hoxd12 は肢芽発生において *Shh* の発現を制御することが示されていることから, 本研究においても *Hoxd12* に着目し, *Shh* ならびに *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現段階では不明である。

【結論】

本研究は, *Hox* 遺伝子群の歯胚発生への関与を検討する事を目的に, 全 *Hox* 遺伝子 39 因子について *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果, 13 因子が歯胚において発現している事が明らかとなった。また, これらのうち *Hoxd12* は, 歯胚発生のキーレギュレーターである *Shh* とエナメル芽細胞分化マーカーである *Ambn* の発現を制御することが歯原性細胞を用いた実験から明らかとなった。

論文審査結果の要旨

転写因子は、標的遺伝子の発現を制御することで、多くの器官発生において中心かつ多彩な役割を担うことが知られており、歯胚発生においても数多くの転写因子が関与していることがヒトやマウスを用いた研究により報告されている。

Hox 遺伝子群は、DNA 結合領域としてホメオドメインを有する転写因子であり、マウスやヒトにおいては 39 因子より構成される。これらは胎生期において体軸のパターン形成に関わる重要な転写因子であることが知られているが、近年これらの遺伝子が個別の器官形成においても機能することが明らかとなってきた。歯の形成過程においても *Hox* 遺伝子が関与している可能性は高いと考えられるが、しかしながら、歯胚発生における *Hox* 遺伝子の関与については現在まで報告が少なく、未だ明らかとされていない。

これらの背景から本研究では歯胚発生と *Hox* 遺伝子の関係を検討することを目的にマウス歯胚における *Hox* 遺伝子の発現パターン解析を、全 39 因子について行った。その結果、*Hoxa3*, *a7*, *a9*, *a11*, *b2*, *b3*, *b6*, *b7*, *c4*, *c11*, *c12*, *d9*, *d12* の 13 因子が発生期歯胚のいずれかのステージにおいて発現していることが明らかとなった。これらのうち、*Hoxb6*, *c12* を除く 11 因子は過去に歯胚における発現を報告したものは無く、本研究において歯胚での発現パターンが初めて示された。

さらに歯胚において発現を検出した遺伝子の中から、歯胚発生の主要制御因子として知られている Sonic Hedgehog (*Shh*) に直接結合し、その発現を制御することが知られている *Hoxd12* に注目し、*Shh* およびエナメル芽細胞分化マーカーのひとつである Ameloblastin (*Ambn*) との関係性を、ラット歯原性上皮細胞株を用いて検討した。その結果、*Hoxd12* 遺伝子の発現を抑制させると、*Ambn* および *Shh* の遺伝子発現は抑制され、他方、*Hoxd12* 遺伝子を強制発現させると、*Ambn* および *Shh* の遺伝子発現は上昇した。このことから、*Hoxd12* 遺伝子が歯原性上皮細胞の分化マーカーである *Ambn* および *Shh* の発現を制御する可能性が示唆された。

以上のことから、本研究は歯の発生機序の解明ならびに歯の再生技術への応用にもつながるものとして評価できる。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。