

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463126

研究課題名(和文) 歯胚消失モデルマウスを用いた基底膜分子の機能的役割の解明

研究課題名(英文) Functional role of basement membrane organization using EL mice with tooth agenesis in the third molar

研究代表者

朝田 芳信 (Asada, Yoshinobu)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：20184145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラミニン-5と基底膜分子の受容体の1つであるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ に異常が生じることで、上皮内の増殖因子であるShhの発現に異常が見られ始め、その影響が 間葉組織のPax9さらにはLef1の発現に影響を与えるため歯胚の形態形成が進行しなくなること、直接的に作用してエナメル芽細胞の極性を失われることで歯胚の形態形成を停滞させた可能性が示唆された。また、インテグリンシグナルを介してエナメル芽細胞の極性形成が誘導されることから、EL/seaではその機能が十分に働かない可能性も考えられた。

研究成果の概要(英文)：A detailed study using in situ hybridization and immunohistological analysis revealed that the absence of third molar (M3) in EL mice is strongly controlled by the interaction between integrin- $\alpha 6 \beta 1$ and laminin-5. Based on the results, it was indicated that abnormality of interaction between integrin- $\alpha 6 \beta 1$ and laminin-5 might induce abnormal expression of Sonic hedgehog (Shh) gene followed by aberration of Lymphoid enhancer-binding factor 1 (Lef1) and Paired box gene 9 (Pax9). These results suggest that integrin- $\alpha 6 \beta 1$ and laminin-5 constituting the basement membrane molecules play an important role in the development of the tooth germs of M3 in EL mice. We concluded that the tooth agenesis of M3 in EL mice is regulated by the basement membrane proteins such as integrin- $\alpha 6 \beta 1$ and laminin-5.

研究分野：小児歯科学

キーワード：基底膜分子 ラミニン インテグリン ELマウス 歯胚消失

1. 研究開始当初の背景

現在まで、歯の発生に関わる分子レベルでの研究には、主にマウスがモデル動物として用いられており多くの知見が得られている (*Genes Dev*, 8:2691-2703,1994, *Dev. Biol*, 278:130-143,2005, *Eur J Oral Sci*, 116:1-10,2008)。さらに、正常な歯胚の初期発生における上皮 - 間葉系組織の遺伝子相互作用の解明が進められている (*Cell* 90:247-255,1997, *Science* 282:1136-1138,1998 *Human Molecular Genetics*, 3605-3617, 2005)。第三臼歯を特異的に欠如する自然発症型マウス (EL/sea) が発見され、ヒトの歯の欠如のメカニズム解明の有用なモデルとなることが報告されている (*Ped Dent J*, 19-20,2000)。そこで、EL マウスを用いることで、歯胚消失のメカニズムを解明し、将来的には歯胚の rescue や第三臼歯の選択的消失という観点から医療の現場に役立てることが可能となる。

近年、歯胚の形成には基底膜分子であるラミニンと歯原性上皮細胞の相互作用が必須であることや上皮細胞側の基底膜分子受容体が歯の発生にとって重要な役割を演じていることが報告されている (*J Biol Chem*. 281:5008-5016, 2006)。基底膜分子受容体として注目されているのがインテグリン $\beta 1$ であり、歯胚上皮における主要なインテグリンは $\alpha 6\beta 1$ と $\alpha 3\beta 1$ であるが、インテグリン $\beta 1$ のコンディショナルノックアウトマウスの研究から上皮のインテグリン $\beta 1$ と基底膜分子の相互作用が内エナメル上皮の分化、特に極性化において重要であることが報告されている (*J Dent Res* 88(6):539-544, 2009)。すなわち、本研究においては、歯の発生過程で重要な上皮 - 間葉系相互作用に対する基底膜分子の役割を検討するとともに、ラミニン - インテグリンを介したシグナル伝達の異常が、歯胚の消失過程にどのように関与しているのかを検討する。

2. 研究の目的

本研究では、自然発症型欠如歯モデルマウスである EL/sea を用い、上下顎第三臼歯に限局した歯胚の発育停止とその後に起こる歯胚の消失メカニズムを解明することを目的とする。すでに、一連の連鎖解析および分子生物学的研究から、EL/sea マウスにみられる歯の欠如には、*Lef1* ならびに *Shh* 遺伝子の関与が強く示唆されている。

本研究の目的は、細胞外マトリクスであるラミニンに注目し、EL/sea マウスにみられる歯胚の発育停止から消失に至る現象が、ラミニン - インテグリンを介するシグナル伝達の異常に起因するの否かを検討することである。EL/sea を用いることで、歯種特異的に歯胚が消失するメカニズムにおいて、細胞外マトリクスの役割と制御機構を解明することが可能と考えられる。さらに、得られた分子生物学的情報からヒトの歯の再生、とくに、発育停止状態にある歯胚を rescue する歯科医療技術の構築を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的観察

正常マウスである EL/Kw の 1 日、5 日、7 日齢と第三臼歯歯胚消失モデルである EL/sea の 5 日、7 日、10 日齢について、*Shh*、*Pax9*、*Lef1*、*laminin-5* ならびに *integrin- $\alpha 6\beta 1$* の抗体で、通法に従い免疫組織学的染色を行った。

(2) *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) による遺伝子発現量の経時的観察

Shh、*Pax9*、*Lef1*、*laminin-5* ならびに *integrin- $\alpha 6\beta 1$* 遺伝子を対象として遺伝子発現の局在を検討するため、EL/Kw の 1 日、5 日、7 日齢と EL/sea の 5 日、7 日、10 日齢のマウスから下顎骨を摘出し、組織の固定・包埋後、凍結切片を作製した。Vector への cDNA のサブクローニング後、テンプレート DNA の作製を行った。さらに、テンプレート DNA を

用いて RNA プローブの作製ならびにテンプレート DNA の除去後、作製したプローブを用い標的遺伝子である *Lef1* および *Shh* のハイブリダイゼーションを非アイソトープ系抗体反応により実施し、シグナルを検出した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学的観察

Shh の発現は、EL/sea と EL/kw の間で大きく異なり、EL/sea の 7 日齢以降は消失傾向で、発現異常は主に上皮側で認められた。*Lef1* の発現は、EL/sea と EL/kw の間で大きく異なり、とくに EL/sea の 10 日齢での発現異常が顕著であり、主に間葉側で認められた。*Pax9* の発現は、EL/sea の 5 日齢以降で EL/kw と比較し、わずかに発現がみられたが、その発現異常は主に間葉側で認められた。*laminin-5* および *integrin- α 6 β 1* の発現は EL/sea と EL/kw の間で大きな違いは認められなかった (図 1 A-B)。

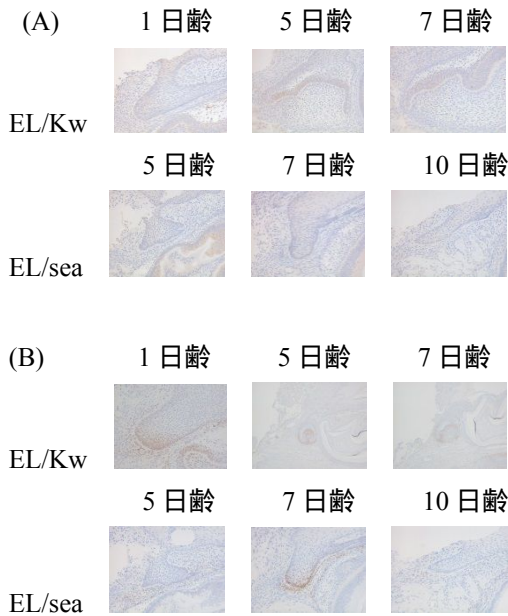


図 1 A (*Shh* の免疫染色 Kw5 日齢と 7 日齢は $\times 100$ 、その他は $\times 200$)

B (*Lef1* の免疫染色 Kw5 日齢と 7 日齢は $\times 100$ 、その他は $\times 200$)

(2) *in situ* ハイブリダイゼーション

Shh の発現は、EL/sea と EL/kw の間で大きく異なり、EL/sea のすべての日齢で発現が認

められなかった。*Lef1* の発現は、EL/sea と EL/kw の間で大きく異なり、EL/sea の 10 日齢では間葉側に極わずかな発現が認められた。*Pax9* の発現は、主に間葉側で認められ、EL/sea の 7 日齢以降で EL/kw と比較し部位特異的な発現はみられなかった。*laminin-5* の発現は、EL/sea と EL/kw の間で異なり、EL/sea では上皮の間葉側に偏るように発現が認められた。*Integrin- α 6 β 1* の発現は、EL/sea と EL/kw の間で異なり、EL/sea では極性を失ったように上皮内に不規則な発現が認められた。(図 2 A-D)。

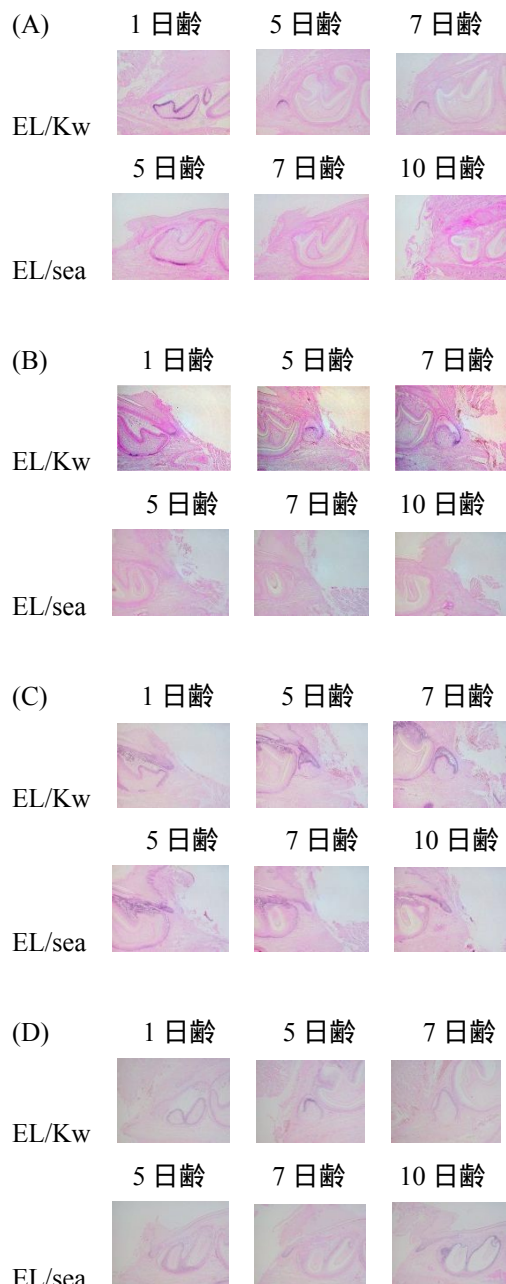


図 2 A (Shh の ISH, × 50) B (Lef1 の ISH, × 50) C (laminin-5 の ISH, × 50) D (integrin-α6β1 の ISH, × 50)

laminin-5 と integrin-α6β1 の発現について、EL/Kw と EL/sea マウスの間で明らかな違いが認められた。とくに、EL/Kw の 5 日齢と EL/sea の 7 日齢の比較において、内エナメル上皮における発現が極性を失っている可能性が示唆された。EL/Kw の 7 日齢と EL/sea 10 日齢においても、同様な所見が得られた。すなわち、laminin-5 と基底膜分子の受容体の 1 つであるインテグリン β1 に異常が生じることで、上皮内の増殖因子である Shh の発現に異常が見られ始め (EL/sea の 5 日齢) その影響が 間葉組織の Pax9 さらには Lef1 の発現に影響を与えるため歯胚の形態形成が進行しなくなること、直接的に作用してエナメル芽細胞の極性を失われることで歯胚の形態形成を停滞させた可能性が示唆された。また、インテグリンシグナルを介してエナメル芽細胞の極性形成が誘導されることから、EL/sea では、その機能が十分に働かない可能性も考えられた。

< 引用文献 >

Fukumoto, S., Miner J.H., Ida, H., Fukumoto, E., Yuasa, K., Miyazaki, H., et al.: Laminin alpha 5 is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape. *J Biol Chem.* 281:5008-5016, 2006

Chen, B., Goodman, E., Lu, Z., Bandyopadhyay, A., Magraw, C., He, T. and Raghavan, S.: Function of β1 integrin in oral epithelia and tooth bud morphogenesis, *J Dent Res* 88(6):539-544, 2009.

Asada, Y. et al: Absence of the third molars in strain EL mice, *Ped Dent J*, 19-20, 2000.

Nomura,R., Shimizu,T., Asada,Y., Hirukawa, S. and Maeda, T.: Genetic mapping of the absence of third molars in EL mice to chromosome 3, *J Dent Res* 82(10):786-790, 2003.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Yayoi Idaira, Takaaki Munemasa、Toshiyuki Fukada、Shinji Shimoda and Yoshinobu Asada, *J Hard Tissue Biology*, 査読有、2016、 25(1)、 49-56

筒井 廉、今井 奨、花田信弘、朝田芳信、リン酸化オリゴ糖カルシウムおよびフッ化物によるエナメル質再石灰化促進効果について、査読有、53 巻 1 号、2015、35-46

Megumi Nariyama, Manami Mori、Emi Shimazaki、Hitoshi Ando、Yoshiki Ohnuki、Tokuhisa Abo、Akira Yamane and Yoshinobu Asada, *Functions of miR-1 and miR-133a during the postnatal development of masseter and gastrocnemius muscles*、*Mol. Cell Biochem*, 査読有、407、2015、17-27
DOI : 10.1007/s11010-015-2450-y

Masumi Ohta、Hiroyuki Nishimura and Yoshinobu Asada, *Association of DLX3 gene polymorphism and dental caries susceptibility in Japanese children*, *Arch. Oral Biology*, 査読有、60、2015、55-61

DOI:10.1016/j.archoralbio.2014.08.020

Takaaki Munemasa、Yayoi Idaira、

Toshiyuki Fukada, Shinji Shimoda and Yoshinobu Asada, Histological analysis of Dentinogenesis imperfect in Slc39a13/Zip13 knockout mice, J Hard Tissue Biology, 査読有、2014、23(2)、163-168

[学会発表](計8件)

田島 格、伊平弥生、成山明具美、朝田芳信：歯胚の消失モデルマウスを用いた基底膜分子の機能的役割について、第55回日本小児歯科学会学術大会、2017年5月25-26日、西日本総合展示場新館・AIM3階(福岡県北九州市)

Nariyama M, Ohnuki Y, Umeki D, Ito A, Kawamura N, Yagisawa Y, Okumura S, and Asada Y : Role of Microphthamia-Associated Transcription Factor in Masseter Muscle Hypertrophy Induced by 2-adrenoceptor Stimulation, 第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年8月24-26日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Nariyama M, Ohnuki Y, Umeki D, Ito A, Kawamura N, Okumura S, and Asada Y : Role of Microphthamia-Associated Transcription Factor in Masseter Muscle Hypertrophy Induced by 2-adrenoceptor Stimulation, P D A A(第10回アジア小児歯科学会), 2016年5月26-28日、東京ドームホテル(東京都文京区)

成山明具美、島崎絵美、安藤 準、大貫芳樹、奥村 敏、朝田芳信：咬筋と腓腹筋の生後発達過程における miR-1, miR-133a の機能、第57回歯科基礎医学会学術大会、2015年9月11-13日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

成山明具美、船山ひろみ、守安克也、井出正道、朝田芳信：鶴見大学歯学部小児歯科学講座における学生実習の現状、第28回日本小児歯科学会関東地方会、2014年9月28日、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

島崎絵美、成山明具美、安藤 準、山根 明、朝田芳信：咬筋における miR-206 とアセチルコリン受容体形成因子との関連性について、第56回歯科基礎医学会学術大会、2014年9月25-27日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

島崎絵美、森愛美、成山明具美、山根 明、朝田芳信：咬合様式の違いが咬筋における miR-206 の発現に及ぼす影響、第52回日本小児歯科学会大会、2014年5月16-17日、品川区立総合区民会館(東京都品川区)

伊平弥生、宗正隆明、薄場れい子、下田信治、朝田芳信：骨形成不全症 型の乳歯象牙質の形態学的観察、第52回日本小児歯科学会大会、2014年5月16-17日、品川区立総合区民会館(東京都品川区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝田 芳信 (ASADA, YOSHINOBU)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：20184145

(2) 研究分担者

伊平 弥生 (IDAIRA, YAYOI)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：40200018

成山 明具美 (NARIYAMA, MEGUMI)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：90440304