The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯胚の発生におけるSonic hedgehogの役割
Author(s)	大盛, 朝玄
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41878
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【10】

氏　　名	大盛朝玄（おおもりともはる）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　15338　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	**歯胚の発生における Sonic hedgehog の役割**
論文審査委員	（主査） 教　授　岡田　宏 （副査） 教　授　栗栖浩二郎　　助教授　西村　理行　　講　師　額田純一郎

論文内容の要旨

【目的】

Hedgehog は、ショウジョウバエ（Drosophila）から脊椎動物に至るまで種を越えて保存されている発生制御因子である。Drosophila の *hedgehog* の mammalian homologue の一つである Sonic hedgehog（Shh）は、上皮間葉相互作用を伴う肢芽や肺、消化管、皮膚付属器などの器官形成に重要な役割を果たすと報告されている。歯の発生は上皮と間葉が相互的かつ連続的に作用しあうことにより進行するが、Shh は歯胚発生過程において全ての時期に部位特異的に発現することから、歯の発生に深く関与する因子と推測される。しかし、Shh の歯の発生過程における生理的な役割は不明である。そこで、本研究では、まず歯の発生過程における Shh 及びその受容体である Patched－1、2（Ptc－1、2）の発現を in situ hybridization により検討した。次に、Shh の mRNA に対する antisense oligodeoxynucleotide（As oligo）を用いて、培養歯胚における内因性の Shh の発現を抑制し、歯の発生過程における Shh の生理的役割を解析した。

【方法】

胎齢12.5日（第一臼歯歯胚の上皮肥厚期）、14.5日（帽状期）、18.5日（鐘状期）のマウスの下顎の切片を用いて Shh 及びその受容体である Patched（Ptc－1、2）の局在を in situ hybridization により検討した。

As oligo には翻訳開始点を含む16塩基を選択した。また、対照群（Control 群）として As oligo に相補的な sense oligo、As oligo と AT－GC 比は同じで一部の塩基を置換した mutant oligo、無作為に置換した random sequence oligo を用いた。これらの oligo は、ヌクレアーゼ耐性の phosphorothioate oligo（S－oligo）で、HPLC 精製したものを使用し、培養液に20 μM 添加した。胎齢11日のマウスより下顎を、胎齢14日マウスより歯胚を採取し、器官培養を行った。培養後、Van Gieson 染色を行い透明標本を作成し、実体顕微鏡下で形態を観察した。その後、paraffin 切片を作成し、HE 染色して組織学的検索を行った。また、一部の培養歯胚は 5'－bromo－2'－deoxyuridine（BrdU）でラベルし、細胞増殖活性を調べた。さらに、培養歯胚を用いて RT－PCR、in situ hybridization、免疫染色を行い、Shh 及びその関連遺伝子の発現レベルを調べた。さらに、培養歯胚に Shh expression vector を導入することにより、As oligo 処理歯胚のレスキュー実験を行った。

【結果】

Shh 及び Ptc－2 は、歯上皮の肥厚期から鐘状期に至るまで歯胚の上皮細胞に発現していた。一方、Ptc－1 は主

に歯乳頭細胞に発現していた。次に、上皮肥厚期～帽状期及び帽状期～鐘状期の歯胚もしくは下顎を、As oligo 処理をして内因性の Shh の発現を抑制することにより、Shh の歯の発生過程における役割について解析した。

まず、RT－PCR、in situ hybridization 及び免疫染色によって、As-oligo が特異的に Shh 及びその受容体である Ptc－１、２の発現を抑制することが確認できた。

そこで、様々な時期の培養歯胚を As oligo で処理して、歯の発生における Shh の役割を解析した。まず、歯上皮の肥厚期にある胎齢11日のマウスより下顎を摘出して培養すると、Control 群は培養５日目で帽状期に達したが、As oligo 処理した試料の歯胚は蕾状期で発生が停止した。この時、Shh 及び Shh 関連遺伝子（Ptc－１、２、Gli－１、Hip）のみならず、歯の発生に重要と考えられている因子である、Bmp－４や Msx－１の発現も低下していることが RT－PCR 及び in situ hybridization によって示された。さらに、細胞増殖活性について検討すると、As oligo 処理した歯胚では歯乳頭細胞の増殖活性の低下が著明であった。次に、帽状期にある胎齢14日のマウスの歯胚を採取して培養すると、Control 群は培養14日目で鐘状期後期に達しており、成熟したエナメル芽細胞が見られ、象牙質の形成も認められた。しかし、As oligo 処理した歯胚は、エナメル器の形成異常が著明で、内エナメル上皮細胞と中間層細胞の分化不全が見られ、象牙質の形成も認められなかった。

また、As oligo 処理による歯の発生阻害は、培養歯胚に Shh 遺伝子を導入することにより、部分的ではあるがレスキューされた。

【結論】

Shh は歯上皮の肥厚期から鐘状期に至る歯の発生の全過程において発現していた。培養歯胚を As oligo で処理することによって、時期特異的な歯胚の発生阻害が認められた。以上の結果より、Shh は歯の形態形成の全ての過程で時期特異的な機能を有する必須の制御因子であることが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は Sonic hedgehog（Shh）の歯の発生における役割について解析したものである。まず、in situ hybridization 法により Shh 及びその受容体である Patched－１、２の発現パターンを詳細に検討している。次に antisense oligodeoxynucleotide（As oligo）を用いて、培養歯胚における内因性 Shh の発現を抑制し、歯の発生過程における Shh の役割について解析している。その結果、Shh は歯胚発生過程において全ての時期に発現しており、また Shh As oligo 処理によって歯の発生の全ての過程で時期特異的な歯の発生阻害が認められた。さらに、electroporation 法により部位特異的に Shh を遺伝子導入することにより As oligo 処理による歯の発生阻害はレスキューされた。以上の結果から、Shh は歯の発生の全ての過程で時期特異的な機能を有する必須の制御因子であることが強く示唆された。

本研究の結果は、歯胚の発生機構について重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。