

Title	歯の発生におけるLhx8の発現と役割の解析
Author(s)	柴口, 竜也
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42836">https://hdl.handle.net/11094/42836</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	柴 口 竜 也
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 16374 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	歯の発生における <i>Lhx8</i> の発現と役割の解析
論文審査委員	(主査) 教授 栗栖浩二郎
	(副査) 教授 米田 俊之    助教授 埴岡 隆    講師 藤原 卓

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

ホメオボックス遺伝子群は、形態形成において重要な役割を担うことが知られているが、その中でも比較的新しいサブファミリーとして *Lim* ホメオボックス遺伝子がある。この遺伝子にコードされる蛋白は、N末端側に2個のLIMドメインと、C末端側にLIMタイプのホメオドメインを有する。LIMドメインは、システインに富んだ特徴的なモチーフで、Znフィンガー構造をとることが明らかになっている。この遺伝子ファミリーに属する *Lhx8* 遺伝子は、*L3* 遺伝子として1996年に同定され、前脳基底部と第一鰓弓に発現することが知られている。しかし、*Lhx8* の歯胚における発現の詳細とその役割については不明である。そこで、本研究では、まず、マウス臼歯歯胚における *Lhx8* 遺伝子の時期および空間的発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法で詳細に検索した。次に、歯胚発生における *Lhx8* の役割を追究するため、マウス培養歯胚にアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドを (AS-ODN) 添加して、*Lhx8* の翻訳を阻害することによって起こる組織学的変化を詳細に観察した。また、BrdU 標識法や TUNEL 法によって、アンチセンス処理によって起こる歯の発生抑制の原因を追究した。

#### 【方法】

胎生13.5~18.5日のICRマウスの臼歯歯胚を含んだ下顎の一部を、4%パラホルムアルデヒドを用いて浸漬固定し、パラフィン切片を作成した。*Lhx8* のオープンリーディングフレームの5'末端を含んだ約1.1kbのcDNAから、<sup>35</sup>S標識したリボプローブを作成し、*in situ* ハイブリダイゼーション法によってマウス臼歯歯胚における *Lhx8* 遺伝子の発現を検索した。

次に、AS-ODNを添加したマウス臼歯歯胚の器官培養系を用いて、歯の発生における *Lhx8* 遺伝子の機能の解析を試みた。胎生12.5日のICRマウスの下顎より、蕾状期の第1臼歯歯胚を摘出し、Trowell法により4~14日間培養した。*Lhx8* に対して合成されたAS-ODNは、*Lhx8* 遺伝子の翻訳開始コドンから始まる15塩基に対するS化ODNで、最終濃度が20μMになるように培地に添加し、培養1日目から2日ごとに培地とともに交換した。対照として、ODN無添加およびランダムシークエンスODN(RS-ODN)添加の培養も行った。AS-ODN処理によって、*Lhx8* 遺伝子の発現が抑制されているかどうかを確認するため、6日間培養した歯胚から抽出したRNAを用いてRT-PCRを行った。培養終了後は、試料にHE染色や鍍銀染色をほどこし、光学顕微鏡にて観察した。AS-ODN添加群培養歯胚に見られた発生抑制の原因を追求するために、BrdU標識法やTUNEL法による検索も行った。さらに、電子

顕微鏡にて、培養歯胚の超微細構造を観察し、TUNEL法で見られたアポトーシスについて検討を加えた。

#### 【結果】

- 1) マウス歯胚における *Lhx8* 遺伝子の発現：蕾状期歯胚においては、将来歯乳頭や歯小囊になる部分の間葉細胞に *Lhx8* が強く発現していた。また、周囲の口腔粘膜上皮直下の間葉組織にも発現が認められた。帽状期歯胚では、歯乳頭と歯小囊にその発現は限局していた。鐘状期前期の歯胚では、発現レベルは少し低くなったが、いぜん歯乳頭に限局していた。硬組織形成の間近い鐘状期の第1臼歯歯胚では、*Lhx8* 遺伝子の発現はほとんど消失していた。歯胚の上皮組織においては *Lhx8* の発現は認められなかった。
- 2) AS-ODN による阻害実験：RT-PCR の結果より、AS-ODN で処理した培養歯胚では *Lhx8* 遺伝子の発現が特異的に抑制されていることが確認された。ODN 無添加群及び RS-ODN 添加群においては、培養期間を通じて正常な歯胚の形成がみられた。しかし、AS-ODN 添加群では、4日間培養した場合はほぼ正常に発生するものの、5～7日間の培養で、間葉における細胞数が減少し、間葉組織自体のボリュームも減少した。さらに、AS-ODN 処理して11～14日間培養をすると、正常な歯胚が形成されず、組織の大部分は上皮組織で満たされ、本来歯胚であったと思われる部分は分化が乏しく、明らかな歯胚の構造は認められなかった。このような AS-ODN 添加群歯胚に見られる発生抑制は、全ての培養歯胚で認められた。7日間の AS-ODN 添加群においては、間葉組織で細胞増殖活性が強く抑制されていた。また、7日間 AS-ODN で処理した培養歯胚においては、TUNEL 陽性細胞が主として間葉組織に多数観察され、アポトーシスによる細胞死が起っていることが示唆された。電顕観察によって、アンチセンス処理した歯胚に認められる細胞死は壊死でなく、アポトーシスであることが明らかになった。また、アポトーシスを示すのは間葉細胞のみで、上皮細胞はほとんど影響を受けないことが裏付けられた。

#### 【結論】

歯の発生における *Lhx8* 遺伝子の機能を解析するため、まず、マウス臼歯歯胚における *Lhx8* の時期および空間的発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法で詳細に検索した。その結果、*Lhx8* の発現は、蕾状期から鐘状期前期にかけての歯胚の間葉細胞に認められた。次に、培養歯胚に *Lhx8* に対するアンチセンスを添加して、*Lhx8* の翻訳を阻害することによって起こる組織学的変化を詳細に観察した。その結果、アンチセンスで処理した培養臼歯歯胚では、間葉組織に特異的な発生抑制が認められた。また、BrdU 標識法、TUNEL 法および電顕による観察を行った結果、この発生抑制は間葉細胞における増殖活性の抑制とアポトーシスの誘発によるものであることが強く示唆された。以上の結果より、*Lhx8* は歯胚の間葉細胞の増殖と生存に必須の転写因子であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、歯の発生における *Lhx8* 遺伝子の機能を解析したものである。まず、マウス臼歯歯胚における *Lhx8* の時期および空間的発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法で詳細に検索した。次に、培養歯胚に *Lhx8* に対するアンチセンス DNA を添加して、*Lhx8* の翻訳を阻害することによって起こる組織学的変化を詳細に観察した。その結果、*Lhx8* の発現は、蕾状期から鐘状期前期にかけての歯胚の間葉細胞にのみ認められた。また、アンチセンス DNA で処理した培養臼歯歯胚では、間葉組織に特異的な発生抑制が認められた。この発生抑制は間葉細胞における増殖活性の抑制とアポトーシスの誘発によるものであることが、BrdU 標識法、TUNEL 法および電子顕微鏡による検索で明らかになった。

以上の結果より、*Lhx8* は歯胚の間葉細胞の増殖と生存に必須の遺伝子であることが強く示唆された。この所見は歯の発生機序の研究に重要な知見を加えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。