

Title	マウス下顎発生におけるbHLH型転写因子dHANDの発現と切歯発生におけるその役割
Author(s)	阿部, 真土
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43658">https://hdl.handle.net/11094/43658</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/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	阿部真土
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第16915号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学基礎系専攻
学位論文名	マウス下顎発生における bHLH 型転写因子 <i>dHAND</i> の発現と切歯発生におけるその役割
論文審査委員	(主査) 教授 重永 凱男  (副査) 教授 米田 俊之    助教授 大島 隆    助教授 脇坂 聡

## 論文内容の要旨

## 【目的】

*dHAND* は bHLH 型の転写因子であり、心臓、肢芽など様々な器官の発生過程で発現することが知られている。*dHAND* 欠損マウスは心臓の形成不全により胎生10日齢で致死であり、また、肢芽前方に異所性に *dHAND* を発現するトランスジェニックマウスは、鏡像対称の過剰指が形成されることが報告されている。これらの知見は、*dHAND* が種々の器官の発生に重要な役割を果たしていることを示唆している。

歯胚が発生する第1鰓弓においても *dHAND* が発現することが報告されているが、その詳細や歯胚発生との関係については不明である。本研究では、歯胚における *dHAND* の発現を詳細に検索するとともに、歯の発生における *dHAND* の役割の解析を試みた。

## 【方法】

1) *dHAND* の発現の解析

胎生10.5日～生後0.5日齢の ICR マウスの頭部を摘出して固定し、一部はパラフィン切片を作成した。遺伝子発現の解析は、全長 *dHAND* cDNA を鋳型にしてプローブを合成し、ホールマウントあるいは切片による *in situ* hybridization を行った。また胎生16.5日齢マウスの上下顎の切歯と臼歯の歯胚を摘出してそれぞれの全 RNA を抽出し、RT-PCR 法にて発現を調べた。

## 2) 切歯の器官培養

胎生14.5日齢マウスより切歯歯胚を摘出し、器官培養を行った。培地は1%FBSを添加した BGJb 培地を用いた。培地交換は培養開始後1日目より2日おきに行った。

## 3) 培養切歯歯胚に対するアンチセンス-オリゴデオキシヌクレオチド (AS-ODN) の影響

*dHAND* の発現を特異的に抑制する AS-ODN を設計した。対照実験には、センス-ODN、ランダム-ODN または ODN 無添加の試料を用いた。AS-ODN 処理の影響は、種々の培養期間の試料を用いて、組織像、細胞増殖活性、アポトーシス、分化マーカーの発現について検討した。

## 4) AS-ODN 処即効果のレスキュー実験

*dHAND* の下流の因子を推定する目的で、AS-ODN とともに SHH、BMP4、bFGF などの成長因子を添加し、それらのレスキュー効果を組織像で解析した。

## 【結果】

### 1) 歯胚における*dHAND*の発現

*dHAND*は、胎生10.5日齢マウスにおいて第1鰓弓の下顎突起の前部にはじめて発現し、上顎突起には発現を認めなかった。胎生12.5日齢～生後0.5日齢マウスにおいては、下顎切歯歯胚を含む間葉細胞に発現を認めた。しかし、上顎および下顎の他の歯胚においては、発生期間を通じて発現を認めなかった。このことは、おのおのの摘出歯胚を用いたRT-PCRによっても確認できた。

### 2) 切歯の器官培養

培養開始時期の胎生14.5日齢マウスの切歯歯胚は帽状期で、象牙質はまだ形成はされていなかった。切歯歯胚は、培養3日目で、apical loopの形成、歯乳頭細胞の象牙芽細胞への分化および象牙質の形成が認められた。培養6日目で、内エナメル上皮細胞の前エナメル芽細胞やエナメル芽細胞への分化が認められた。培養11日目では、エナメル基質の産生が認められた。

### 3) 切歯培養系に対するAS-ODNの影響

培養3日目においてAS-ODN添加群は無添加対照群と比べてapical loopの構造が貧弱であったが、その他の部位には明らかな組織学的な差異は認められなかった。培養6日目では、対照群で正常な歯胚の形成が認められるのに対して、AS-ODN添加群では全ての試料で歯胚の上皮、間葉いずれの細胞にも正常な分化が認められなかった。培養3日目でAS-ODN添加群の細胞増殖活性は、上皮と間葉のいずれにおいても対照群に比べて減少していた。アポトーシスを示すTUNEL陽性細胞は、AS-ODN添加群では対照群に比べて、歯胚組織全体に認められた。歯乳頭細胞の分化の指標であるアルカリフォスファターゼ活性を調べたところ、AS-ODN添加群は対照群に比べて低下していた。また、内エナメル上皮細胞の分化マーカーであるアメロゲニンの分布を調べたところ、AS-ODN添加群は対照群に比べて抗体の反応性が低下していた。

### 4) AS-ODN添加群のレスキュー実験

検索した成長因子のうち、bFGFに有意なレスキュー効果が認められ、培養6日目において象牙質の形成(5/12)、エナメル芽細胞の分化(4/12)が認められた。しかし、正常なapical loopの構造は認められず(0/12:0%)、培養歯胚のサイズは対照群と比べ小さかった。それに対してSHH、BMP4によるレスキューは見られなかった。

## 【結論】

- 1) *dHAND*の発現は、下顎の切歯歯胚の間葉細胞に認められ、上下顎の他の歯胚には認められなかった。
- 2) *dHAND*は、下顎切歯歯胚細胞の生存、増殖および分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。
- 3) *dHAND*の下流にはbFGFが関与していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、マウス下顎における転写調節因子*dHAND*の遺伝子発現、ならびにその機能を検討したものである。その結果、*dHAND*は発生を通じて下顎切歯を含む間葉系細胞に発現が認められた。また、下顎切歯器官培養系を用い、*dHAND*の作用を抑制することで下顎切歯の形態形成阻害が認められた。これらのことから、*dHAND*は下顎切歯形態形成に必須の転写因子であることが示唆された。

以上の研究結果は、切歯形態形成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。