

論文要旨等報告書

| | |
|---------|---------------------------------------|
| 氏 | 内部 健太 |
| 授与した学位 | 博士 |
| 専攻分野の名称 | 歯学 |
| 学位授与の番号 | 博 甲 第 3 8 2 9 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 2 1 年 3 月 2 5 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(学位規則第4条第1項該当) |
| 学位論文題名 | 発生期歯胚において発現する転写制御関連遺伝子群の同定とその発現パターン解析 |

論文審査委員 教授 山城 隆 准教授 久保田 聡 教授 窪木 拓男

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯の再生は歯科医学にとって究極の目標と言っても過言ではない。近年、齧歯類の歯の再生技術は著しい進展を遂げ、ヒトへの応用が期待されている。しかしながら、これらの齧歯類での報告においても再生された歯の形態や大きさの制御は達成されておらず、将来的なヒトへの臨床応用に向けて解決すべき課題として残されている。

この課題を解決するひとつのアプローチとして、歯の発生メカニズムを解明することが挙げられる。歯の発生は、シグナル分子や転写因子をはじめとした、多くの遺伝子によって緻密な制御を受けており、なかでも転写因子は重要な役割を担っていることがヒトやマウスの研究で明らかとなっている。しかしながら、歯の発生メカニズムの全貌はいまだ不明な点を多く残しており、その背景には未解明の分子機構や未報告の遺伝子が存在していることが原因のひとつとなっていると推測されている。

そこで本研究では歯の発生や形態制御に関与する新規遺伝子群を同定することを目的とし、マウス遺伝子発現データベースと *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて転写制御関連遺伝子に焦点を当て包括的なスクリーニングを行った。

【材料および方法】

- 候補因子の抽出：発生期歯胚で発現する候補因子は、国立成育医療センター研究所で構築されたマウス遺伝子発現データベース「EMBRYOS」から抽出した。すなわち、本データベースに収容されている転写制御関連遺伝子 1520 因子の中から、胎生 11.5 日胚の上顎突起あるいは下顎弓に発現している因子をすべて抽出した。
- 歯胚での発現の検証：マウス胎生 13.5 ならびに 14.5 日胚の前頭断組織切片を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて全ての候補因子の歯胚での発現の有無を検証した。そのうち、歯胚での発現を確認できた因子については、胎生 16.5 および 18.5 日胚においても同様に発現パターンを検証した。

【結果と考察】

1. 候補因子の抽出：「EMBRYS」に收容されている転写制御関連遺伝子のうち、207因子が胎生 11.5 日胚の上顎突起あるいは下顎弓に発現していた。そのうち、45 因子は既に歯胚での発現が報告されているものであったため除外し、残りの 162 因子を更なる解析の対象とした。*Msx1*, *Lef1* など既報の 45 因子については、*in situ* ハイブリダイゼーション法で報告通りの発現パターンを確認した。

2. 歯胚での発現の検証：歯胚での発現の報告のない 162 因子について、マウス胎生 13.5 および 14.5 日胚の前頭断組織切片上で、*in situ* ハイブリダイゼーション法により歯胚での発現の有無を検証した。その結果、134 因子についてはいずれのステージにおいても歯胚での発現を認めなかった。歯胚での発現を確認できた残りの 28 因子のうち、15 因子が DNA 結合ドメインを有する転写因子、13 因子が転写コファクターなどその他の転写関連因子であった。15 の転写因子の中には、胎生期の体軸のパターン形成に関わる Hox 遺伝子である *Hoxb6* や *Hoxc12*、同じファミリーに属する遺伝子が歯胚発生に重要であることが報告されている *Pitx3* などが含まれていた。また、ヒトでの変異により先天的な歯数不足を呈する事が報告されている *Tcfap2b* も含まれていた。その他の転写制御関連遺伝子の中には、基本転写因子 TFIIID の複合体に含まれ、転写コファクターとして働く *Taf10* などの因子があった。

歯胚での発現が新たに確認されたこれらの 28 因子については、歯胚での発現パターンをより詳細に検討するため、発生ステージを広げて、胎生 16.5 および 18.5 日胚の歯胚での発現パターンも確認を行った。その結果、発現する発生ステージが限られているものや、発生ステージによってその発現パターンに変化の見られるものなどがあった。例えば、非ヒストンクロマチンタンパクである *Hmga2* は、13.5 日胚から 16.5 日胚までの歯胚においては歯胚上皮に広範に発現が確認されたが、発生の進んだ 18.5 日胚においては内エナメル上皮の先端部にのみ限局した発現を検出できた。この他、*Hnrpab* などはエナメル結節を避けた領域に発現するなど、興味深い発現パターンを示すものが見出された。

本研究は、当初の推測通り、歯の発生に関わる未報告の遺伝子が多数存在する事を明らかにした。今後これらの因子の歯胚発生における機能を解析することで、歯の発生メカニズムの解明に多大な貢献をするものと考えられる。また、これらの発生学的知見は歯の再生技術の進展にも貢献するものと期待できる。

【結論】

・マウス遺伝子発現データベースならびに *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた包括的スクリーニングを行い、歯胚で発現する未報告遺伝子 28 因子を同定した。

・新規因子の歯胚における発現パターンを、歯胚発生初期の蕾状期から細胞分化が開始する鐘状期後期まで時間空間的に検討し、興味深い発現パターンを示すものが見いだされた。

論文審査結果の要旨

近年、歯の再生は歯科医学の究極の目標として盛んに研究され、著しい進展を遂げている。しかしながら、これまでに再生歯の形態や大きさの制御はもとより、歯胚形成を司る上皮間葉相互作用のメカニズムはほとんど解明されていない。したがって、歯の発生過程でどのような制御がなされているのかを遺伝子発現という観点から包括的・網羅的に解明する必要があるがあった。

本研究は、発生期歯胚に発現する未報告の遺伝子群を、転写因子に焦点を当て同定することを目的に、遺伝子発現データベースと*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて包括的にスクリーニングを行ったものである。また、同定された新規遺伝子の歯胚における発現パターンを、複数の発生ステージにおいて検討している。

その結果、1) これまで報告のなかった*Tcfap2b*, *Hoxb6*などに代表されるDNA結合ドメインを有する転写因子が15因子と、*Taf10*を含む転写コファクターなどの遺伝子が13因子の、計28因子が歯胚で発現していた。2) それぞれの遺伝子が蕾状期、帽状期、鐘状期、後期鐘状期において時間空間特異的な発現パターンを示すことが明らかとなった。

これらの知見は、これまでに行われていなかった包括的なアプローチによって、歯胚で発現する新規遺伝子を複数同定しており、歯の発生メカニズムを理解していく上で非常に重要な知見と考えられる。また、実験計画、実験手技、結果に対する評価および考察も適切に行われていると判断できる。よって本論文は博士(歯学)の学位授与に十分値するものと判断した。