学位論文審査レポート

Effects of *Usag-1* and *Bmp7* deficiencies on murine tooth morphogenesis

(*Usag-1*と*Bmp7*の発現量減少はマウスの歯の形態形成に影響を与える)

京都大学大学院医学研究科感覚運動系外科学講座口腔外科学分野

斎藤　和幸

1. 研究目的と研究方法を選択した根拠

ヒトの永久歯は種類があり、歯種により大きさが異なる。歯の欠損部位は歯科の保険診療においてブリッジ、義歯、保険外診療では歯科インプラントなどで治療されている。 従来の代替治療法として、歯の再生療法があり、再生歯は歯隙の大きさに合わせる必要がある。

本分野において取り組んでいる歯の再生研究の内容は二つある。第一のアプローチ方法は、USAG-1の分子標的治療による第3歯堤を利用した歯の再生である。第3歯堤の出現は生後であるため、遺伝子発現調節システムを用いて、必要な時期に賦活化させるなど、臨床応用の展開が期待できると思われる。第3歯堤による歯の再生では、先行歯と形態・大きさが類似することが予想される。前歯小臼歯には第3歯堤が存在するが、加生歯である大臼歯部では第三歯堤は存在しないため、二つ目のアプローチ方法は、大臼歯において歯胚発達時期のみ特異的に*Cebpβ*と*Runx2*の機能抑制をすることにより、永久歯胚の外エナメル上皮などのエナメル上皮幹細胞の分化増殖を促進させる歯の再生である。二つ目のアプローチでは、多数の歯胚が形成され、歯の大きさは規制できないことが予想され、歯の大きさを調節する技術は必須である。

エナメル上皮幹細胞を用いた大臼歯での歯の再生を実現するために、歯の大きさを調節する候補遺伝子を探索することは重要である。

我々は、*Usag-1*-/-マウスにおいて、上顎切歯部に過剰歯が生じること(Murashima-Suginami et.al., BBRC, 2008)を報告している。*Usag-1*-/-マウスでは歯原性間葉にリン酸化Smadと核移行したβ-カテニンの増加を認め、*Bmp*と*Wnt*のシグナリング亢進が過剰歯の発生に関与していた。

過剰歯を有するヨーロッパ人59名（男39名、女21名）と同じ男女構成の対照群を用いて永久歯歯冠幅径を調査したところ、下顎第二小臼歯において、過剰歯を有する患者群が有意に大きくなる傾向があった。他の歯種では有意差を認めないものの、平均値において同様の傾向が認められた (A.H.Brook et.al, AOB, 2009)。従って、過剰歯の存在と歯の大きさに相関があると考えられた。

また、過去に報告されていた胎生期における歯胚への*Wnt*のGain-of-function、Loss-of-functionによって歯が縮小する報告がある。*Wnt*のアンタゴニスト*Mfrzb1*をBud stageのマウス培養歯胚へ添加し、腎被膜下移植にて培養し、歯が縮小した(Shaker and sharpe et.al., JDR, 2000)。 *Wnt5a*-/-マウスにおいて、象牙質の低形成を伴った歯の縮小が生じた(Lin et.al, Dev Dyn.et. al., 2011) 。 *Wnt5a*をマウス培養歯胚へ添加し、腎被膜下移植にて培養し、歯が縮小した(Cai et.al., Cell Tissue Res, et.al, 2011) 。また、胎生10日目のマウス切歯歯胚にBMPの拮抗分子*Noggin*を加え、腎被膜下移植することで、歯の形態が変化し、臼歯に似た形態あるいは縮小していた(Sharpe, Science, 1998)。従って、*Wnt*と*Bmp*シグナリングが歯の大きさをコントロールする有力な候補遺伝子であると考えた。また、本分野においてKOマウスの実験において*Usag-1*は*Bmp*ファミリーの中で*Bmp7*が胎生期の上顎切歯部過剰歯の発達において拮抗する関係にあった (Kiso et.al, PLOS ONE, 2014)。

京大総合博物館と本分野の共同研究の内容であるが、本分野で解析しているUSAG-1とBMP7改変マウスの下顎臼歯のデータを用いている。博物館所蔵の化石サンプルや現存する野生動物と本分野の*Bmp7*と*Usag-1*改変マウスの臼歯咬合面投影面積を測定する研究を行った。下顎臼歯はM1・M2・M3と3本あるが、その相対サイズを利用したモデルにInhibitory cascade model (Kavanagh et. al., Nature, 2007) (Polly et.al., Nature, 2007) があり、また、切り裂きに関わるトリゴニッドとすりつぶしに関わるタロニッドの部分に分けられる(Asahara et.al. Ecology & Evolution, 2013)（図１）。哺乳類の中に捕食者として特化した食肉目というグループがある。イヌ科、ネコ科、イタチ科、クマ科などである。*Bmp7*+/-マウスは、M2が有意に大きくなり、タロニッドの割合が有意に増大していた。Inhibitory cascade modelにおいて、クマ科は食肉目の特徴的な変異性に従って徐々に進化した延長線上にあり、その変化は*Bmp7*の歯の形態変化の方向性と類似していた。そこで、EMBL/Genbankから哺乳類各種のBMP7遺伝子の配列を入手し、遺伝子配列の進化を最尤法により推定、非同義置換／同義置換の比率を算出した。その結果、現生クマ科の系統で高い非同義置換／同義置換比（Fisher’s exact test; p<0.05）を得た。BMP7に選択圧がかかって適応進化が起きたことが言える。これらのことから、進化学的にも*Bmp7*の機能低下が歯の大きさに強い影響を与えていることが明らかとなった(Masakazu Asahara, Kazuyuki Saito et.al, PROCEEDINGS B, 2016)。

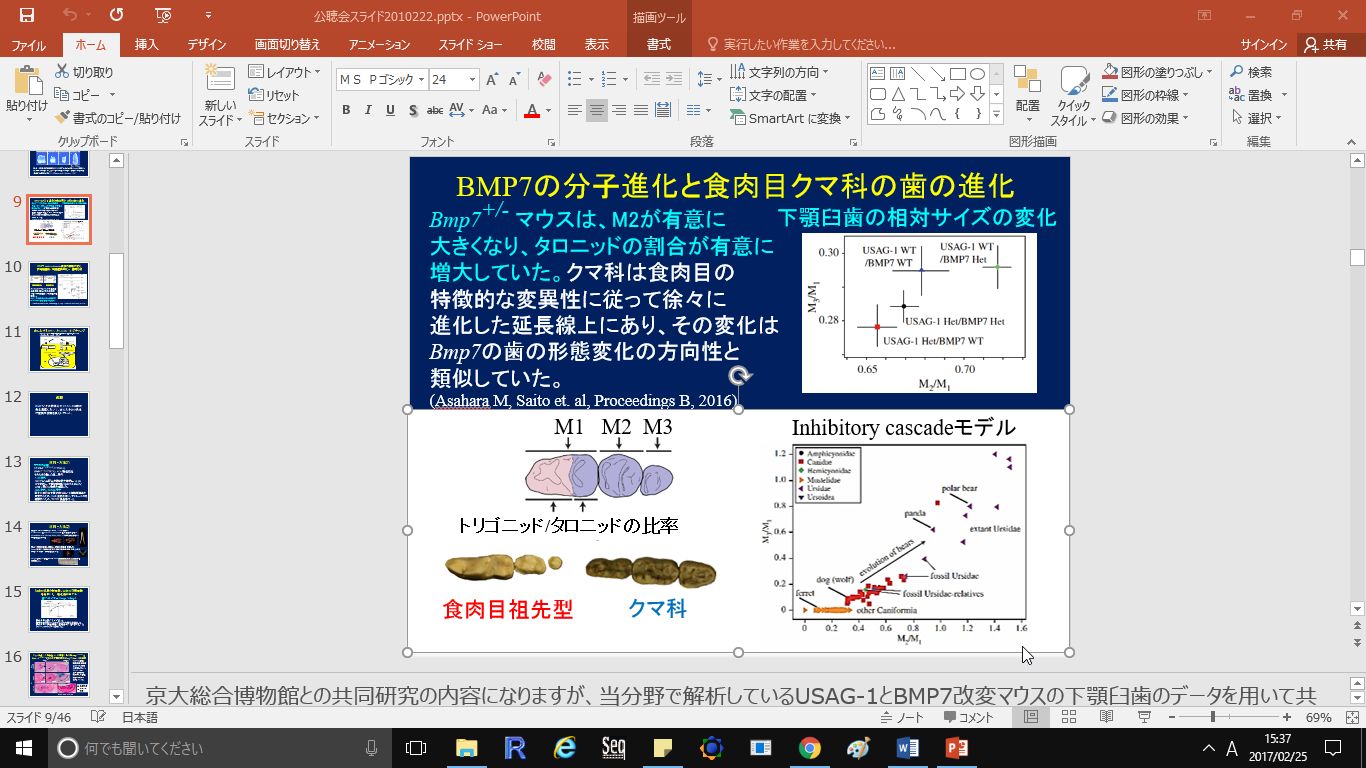


図1

*Usag-1*は*Bmp*シグナリングと*Wnt*シグナリングを抑制する働き（図２）がある。また、*Bmp*と*Wnt*はそれぞれ歯の大きさに関わるという報告がある。また、*Bmp7*と*Usag-1*が過剰歯の発生に拮抗的な働きを示し、過剰歯の発生は歯の大きさと関係があるとの報告がある。

我々が渉猟した限りでは、*Bmp7*、*Usag-1*が歯の大きさに関わる事に関する過去の報告は存在しなかった。そこで、BMP7とその拮抗分子USAG-1は歯の発生過程において、歯の大きさの決定に重要な役割を果たしているという仮説を立て、*Bmp7*と*Usag-1*のそれぞれの改変マウスそしてDKOマウスを作製し、得られた遺伝子型の歯の大きさを比較し解析した。*Bmp7*,*Usag-1*の改変マウスは対応する遺伝子の遺伝子型によって、同一バックグラウンドの間で、歯の大きさを比較するために用いた。DKOマウスは、歯の大きさに対する*Bmp7*と*Usag-1*の遺伝子型の相互作用を確認するために作成した。マウスの交配に関して、第二世代は雑種強勢という長所を持ち、それ以降も交配を進めると、近交弱勢により、集団の中で分離される有害な劣性対立形質が明らかになるため、DKOマウスは第二世代で解析を行った。

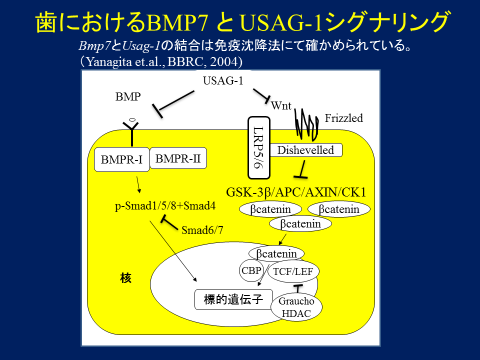


図２

参考文献:

Murashima-Suginami A, Takahashi K, Kawabata T, Sakata T, Tsukamoto H, Sugai M, Yanagita M, Shimizu A, Sakurai T, Slavkin HC, Bessho K et al: Rudiment incisors survive and erupt as supernumerary teeth as a result of USAG-1 abrogation. Biochemical and biophysical research communications 2007, 359(3):549-555

Brook AH, Griffin RC, Smith RN, Townsend GC, Kaur G, Davis GR, Fearne J: Tooth size patterns in patients with hypodontia and supernumerary teeth. Archives of oral biology 2009, 54 Suppl 1:S63-70.

Sarkar L, Sharpe PT: Inhibition of Wnt signaling by exogenous Mfrzb1 protein affects molar tooth size. Journal of dental research 2000, 79(4):920-925

Lin M, Li L, Liu C, Liu H, He F, Yan F, Zhang Y, Chen Y: Wnt5a regulates growth, patterning, and odontoblast differentiation of developing mouse tooth. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 2011, 240(2):432-440.

Cai J, Mutoh N, Shin JO, Tani-Ishii N, Ohshima H, Cho SW, Jung HS: Wnt5a plays a crucial role in determining tooth size during murine tooth development. Cell and tissue research 2011, 345(3):367-377.

Kiso H, Takahashi K, Saito K, Togo Y, Tsukamoto H, Huang B, Sugai M, Shimizu A, Tabata Y, Economides AN et al: Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formations. PloS one 2014, 9(5):e96938.

Kavanagh KD, Evans AR, Jernvall J et. al.: Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. Nature 2007, 449, 427–432.

Polly PD. et.al, Development with a bite. Nature 2007, 449, 413–415.

Asahara M.et. al., Unique inhibitory cascade pattern of molars in canids contributing to their potential to evolutionary plasticity of diet. Ecol. Evol. 2013, 3,278–285.

Masakazu Asahara, Kazuyuki Saito, Takushi Kishida, Katsu Takahashiand Kazuhisa Bessho: Unique pattern of dietary adaptation in the dentition of Carnivora: its advantage and developmental origin. Proc. R. Soc. B 2016, 283.

2. ICRとC57BL/6を交配したマウスを解析するときに留意すべきこと

体の大きさと形などはマウスの系統亜間で変化しやすい特性である。表現型はバックグラウンド遺伝子の作用と体全体のシステムに影響を及ぼしている他の全遺伝子の作用とが生み出したものであり、表現型の浸透度、表現度は遺伝的背景によって異なる。変異遺伝子以外の遺伝子が表現型に及ぼす影響は遺伝的背景による影響として知られ、それらを引き起こす遺伝子が修飾遺伝子である。第二世代マウスは遺伝的差異が生じうるため、表現型が遺伝的背景の変動の影響を受けることを考慮しなければならない。

交雑系のICRと近交系のC57BL/6では本論文のFigure.1 のLacZノックインマウスにおけるX-gal染色において明らかなように胎生14、15日目における歯胚の発達速度が異なることが挙げられる。ICRのクローズドコロニーは遺伝的な形質が均一ではないことも問題点として挙げられる。戻し交配によって、ICRマウスを10世代ほど近交系のC57BL/6と交配を繰り返すと近交系ゲノムが99.8%に達する。

*Usag-1*-/-マウスは繁殖能力に問題があり、*Bmp7*-/-は胚性致死であるため、出生しない。今回は*Bmp7*+/- (ICR)と*Usag-1*+/- (C57BL/6)を交配して得た1/4の確率で得られる第一世代F1 *Bmp7*+/- *Usag-1*+/-を作製し、それらを交配して得た第二世代を得た（図３）。それらの雌雄を掛け合わせることで、第二世代において、*Usag-1*-/-*Bmp7*+/-、*Usag-1*-/-*Bmp7*+/+の遺伝子型を得ることができる。第一世代ではこれらの遺伝子型を得ることができない。また、KO個体を得られること、早急に実験結果を得たいという理由から第二世代で解析を行った。

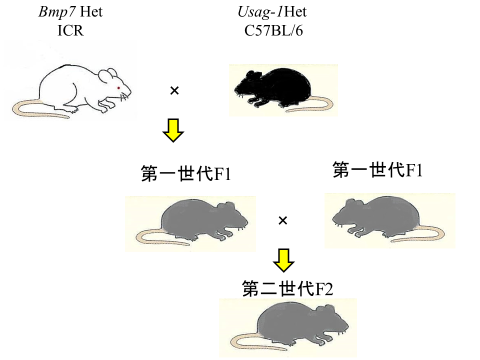


図３

第一世代はICRが50％、C57BL/6が50%の遺伝的背景となる。第二世代F2では第一世代雌雄の*Bmp7*+/- *Usag-1*+/-のマウスの遺伝子背景を50%ずつ有している。第二世代は雑種強勢という長所を持つ。雑種強勢（ヘテローシス）とは、同一種内のある特定の組み合わせの両親間の交雑により得られたF1雑種個体が、両親の特性よりも活動性と繁殖力など優れた形質を示す現象である。多くの遺伝子座におけるヘテロ接合性が関与しており、遺伝的に均一となる。第二世代は遺伝子構成が減数分裂時の交差により異なるために、第二世代では連鎖する遺伝子群には組換えが生じるため、第二世代動物はそれぞれ特有の遺伝子構成を持つ。第二世代以降は近交弱勢により、集団の中で分離される有害な劣性対立形質が明らかとなる場合があるため、第一世代の方が強いといえる。

　遺伝的バックグラウンドの差が歯の大きさにおいて、どの程度影響を与えるかを考慮するため、実際のマウスのWild typeのデータを下記にまとめた。

下顎切歯の体積(mm3)は以下の通りであった。

F0 ICR WTサンプル数22

体積 平均値2.79 不偏標準偏差 0.449標準誤差0.0958

F0 C57BL/6 WT サンプル数21

体積 平均値2.86 不偏標準偏差0.295標準誤差0.0645

F2 WTWT サンプル数 9

体積 平均値3.22 不偏標準偏差 0.502標準誤差0.167

F0ICR、F0C57BL6、F2のWild-typeの下顎切歯の体積の平均値と標準誤差を示し、母平均の推定の範囲を示した（図4）。

図４

全サンプルの測定値を示した(図５)。

図５

下顎切歯の断面積(mm2)は以下の通りであった。

F0 ICR WTサンプル数22

断面積 平均値0.231 不偏標準偏差 0.0249標準誤差0.00531

F0 C57BL/6 WT サンプル数21

断面積　平均値0.222 不偏標準偏差 0.0224標準誤差0.00490

F2 WTWT サンプル数 9

断面積　平均値0.252 不偏標準偏差 0.0401 標準誤差0.0133

F0ICR、F0C57BL6、F2のWild-typeの下顎切歯の断面積の平均値と標準誤差を示し、母平均推定の範囲を示した（図６）。

図６

バックグラウンド別に全サンプルの測定値を示した(図７)。

図７

　F2WTWTマウスが体積断面積共にF0ICRWTマウス、F0C57BL/6WTマウスより増大傾向があり、誤差範囲も増大していた。Anderson Darling検定の結果、F0C57BL/6WTの体積においてのみノンパラメトリックで他は正規分布であることがわかった。

バックグラウンド別に下顎切歯体積において有意差検定を行なった。

t検定を用いて次のような結果を得た。

F2WTWT：F0ICR p値0.0280

Mann Whitney U testにて次のような結果を得た。

F2WTWT:F0C57BL/6WT p値0.0353

F0ICR:F0C57BL/6WT p値0.697

バックグラウンド別に下顎切歯断面積において有意差検定を行なった。

t検定を用いて次のような結果を得た。

F2WTWT：F0ICRWT p値0.0910

F0ICRWT:F0C57BL/6WT p値0.208

Welchのt検定にて次のような結果を得た。

F2WTWT:F0C57BL/6WT p値0.0614

　F2マウスが体積断面積共にF0ICRWTマウス、F0C57BL/6WTマウスより増大傾向があり、体積では有意に増大傾向を認めた。ばらつきを示す不偏標準偏差、母平均の推定を示す標準誤差も増大していた。体積の平均値でF0C57BL/6マウスはF0ICRマウスより2.5%大きく、F2マウスはF0ICRマウスより9.09％大きく、F0C57BL/6マウスより13.5％大きかった。断面積の平均値でF0ICRマウスはF0C57BL/6よりマウス4.05%大きく、F2マウスはF0ICRマウスより15.4％大きく、F0C57BL/6マウスより12.5％大きかった。雑種強勢が歯の大きさに影響を与えていると考えられた。今回は、ICRバックグラウンド、C57BL/6バックグラウンド、第二世代のバックグラウンドに条件を揃えて、遺伝子型別の歯の大きさを比較したため、バックグラウンドによる歯の大きさの影響は除く形で結果を解釈し結論を得た。一方、第二世代マウスにおいては、個々のマウスのバックグラウンドの遺伝子差異があるため、データのばらつきが近交系マウスに比べ大きいため、サンプル数をできる限り増やすことや一般化線形モデルを使用する手法を用いて、*Usag-1*と*Bmp7*の遺伝子型と歯の大きさの相関関係を調べた。一般化線形モデルとは、ある要因（x：説明変数）の有無や量の違いに伴って、別の量（y：目的変数）などに違いが見られるという状況で用いられる、データを解析するための統計手法である。説明変数が、目的変数に与える影響を分析する方法を構成要素に分けて見ることにより、統一して理解しやすくするものである。説明変数は量的なものでも、質的なものでも、かまわないし、目的変数も量的なものでも、質的なものでもかまわない。一般化線形モデルは、伝統的に広く使われてきた回帰を大幅に拡張し、より広い範囲で使えるようにしたものである。説明変数の値から目的変数の予測値が決まり、目的変数の実際の値はその予測値の周りにばらつくと考える。このばらつきを誤差というが、誤差構造は今回正規分布に従うとした。誤差構造は、他に二項分布、ポアソン分布、ガンマ分布（指数分布を含む）がある。目的変数を歯のサイズとし、説明変数をカテゴリカルデータの遺伝子型とした。リンク関数は線形モデルを用いた。USAG-1とBMP7の交互作用と主効果（単独での作用）を特定し、判別するためとカテゴリカルデータを説明変数として用いるために、一般化線形モデルを用いた。下顎切歯の体積についての交互作用をみた一般化線形モデルの結果は以下の二つである（表１、２）。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Estimate | Std.Error | t value | p value |
| *Usag-1*Het | -0.213 | 0.157 | -1.35 | 0.179 |
| *Bmp7*Het | 0.257 | 0.119 | 2.14 | 0.0343 |
| *Usag-1*Het:*Bmp7*Het | 0.0280 | 0.197 | 0.142 | 0.887 |

表１

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Estimate | Std.Error | t value | p value |
| *Usag-1*KO | 0.253 | 0.144 | 1.75 | 0.0827 |
| *Bmp7*Het | 0.288 | 0.118 | 2.43 | 0.0168 |
| *Usag-1*KO:*Bmp7*Het | 0.0113 | 0.199 | 0.057 | 0.954 |

表２

下顎切歯の断面積について交互作用をみた一般化線形モデルの結果は以下の二つである（表３、４）。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Estimate | Std.Error | t value | p value |
| *Usag-1*Het | -0.0224 | 0.0123 | -1.82 | 0.0716 |
| *Bmp7*Het | 0.0256 | 0.00936 | 2.73 | 0.00736 |
| *Usag-1*Het:*Bmp7*Het | -0.00163 | 0.0154 | -0.106 | 0.915 |

表３

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Estimate | Std.Error | t value | p value |
| *Usag-1*KO | 0.0349 | 0.0112 | 3.10 | 0.00251 |
| *Bmp7*Het | 0.0322 | 0.00925 | 3.48 | 0.000756 |
| *Usag-1*KO:*Bmp7*Het | -0.0137 | 0.0155 | -0.883 | 0.379 |

表４

下顎大臼歯３歯の咬合面外形の面積の合計をみた一般化線形モデルを示す（表５）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Estimate | Std.Error | t value | p value |
| *Usag-1*Het | -0.137 | 0.0431 | -3.17 | 0.00225 |
| *Bmp7*Het | 0.0142 | 0.0431 | 0.330 | 0.742 |
| *Usag-1*Het:*Bmp7*Het | 0.122 | 0.0521 | 2.35 | 0.0215 |

表５

一般化線形モデルを用いることで、*Usag-1*と*Bmp7*の遺伝子型と歯の大きさ（下顎切歯の体積と断面積、下顎大臼歯の咬合面外形の面積）の関係を理解することができた。また、下顎切歯の体積、断面積においては、交互作用の相関が小さく、主効果の相関が強いこともわかった。しかし、下顎大臼歯の合計では交互作用の影響が強いこともわかった。その理由としては、代生歯と加生歯の違い、形態形成に関わる遺伝子の違い、大臼歯においてKO個体は癒合が生じるため、解析に用いなかったこと、大臼歯は３歯存在することなどが挙げられる。本論文では交互作用については、結論に至る十分なデータを有しないため、交互作用項の無い一般化線形モデルを用いた。

　今回は戻し交配を10世代行うことで著しく時間を要するため、ICRバックグラウンドのマウスを用いた。ICRバックグラウンドの遺伝子改変マウスとC57BL/6バックグラウンドの遺伝子改変マウスを用いたDKOマウスの解析が散見されている(X.P.Wang et al., JDR, 2005)(Andrea Braun et.al., Experimental Dermatology, 2016)。

　理想的には、戻し交配を行い、同じバックグラウンドの近交系に揃えること（コンジェニック系統を作製する）に留意すべきであった。

参考文献:

X.-P. Wang, T. Åberg1, M.J. James1, D. Levanon, Y. Groner, and I. Thesleff: Runx2 (Cbfa1) Inhibits Shh Signaling in the Lower but not Upper Molars of Mouse Embryos and Prevents the Budding of Putative Successional Teeth: J Dent Res 2005, 84(2):138-143.

Andrea Braun, Stephanie Schlickum, Nadin Dewert, Margarete Schon and Michael P. Schon: Integrin aE(CD103) is induced but plays no pathogenic rolein psoriasiform skin lesions of TGFb1 transgenic mice, Experimental Dermatology, 2016, 25, 311–313.

3. Intra-observer, Inter-observer errorについての考察

今回測定者は一人で行ったが、測定者を複数設ける方が、測定者の主観的な判断などがデータに影響する可能性を排除できると思われる。

検査の検者内または検者間信頼性(再現性)の指標として級内相関係数(ICC: intraclass correlation coefficient: (Si) の分散 / (Si+Rj+εijk) の分散 , Yijk = Si+Rj+εijk, Yijk: 評価kにおける観察者jの全スコア,　Si: 参加者iの真の値, Rj: 観察者jの効果, εijk:その他の誤差) (Kazuo Yonenobu, SPINE, 2001)というものがある。評価者が対象に対する評価を行った際、評価者内もしくは評価者間における評価の一致度や信頼性を示すための指標である。評価者内信頼性は、同一評価者による2回以上の繰り返し評価データの一致度である。また、評価者間信頼性は、2人以上の評価者が同じ対象を評価したときの一致度である。級内相関係数は、－1以上1以下の値をとる。0に近づくほど信頼性は低く、絶対値が1に近いほど信頼性は高くなる。負の相関がある場合にはマイナスの値となる。フリーソフトウェアのR（psychパッケージ)、SPSSを用いて、算出できる。測定者を複数設ける場合は、測定器の取り扱いの習熟度、データの測定方法などに注意する必要がある。測定方法の標準化と測定者の教育によって、測定者の固有誤差を除くべきである。また、測定者間で複数回、データの解釈について相談すべきである。

　測定誤差は同一サンプルを図ったときの測定内のデータ間のばらつきを指すが、今回はサンプルの下顎切歯の体積測定はパソコンのソフトウェア上で自動算定されるため、一度の測定を行った。断面積、大臼歯の投影面積の測定はImage Jで行っているが外形が定まっているため、一度の測定を行った。京大総合博物館との共同研究を行い、大臼歯の投影面積の測定方法は、Kavanagh et al. (2007)と同様の方法で計測した(Kavanagh et. al., Nature, 2007)。切歯に関しては、彎曲した形態であるため、出生後マウスの頭部を島津製作所のμCT(SMX-100XT-SV3)にて撮影し、CYBERNET社のINTAGE Realiaにて三次元構築を行い、(Hiroshi Ito et.al :Skeletal Radiol,　2009)、下顎切歯を抽出し、体積測定を行った。咬合や咬耗の影響、Image Jを用いて歯軸に直交する面で舌側歯槽骨の最上点の部位にて切断し、断面積を求めた。

測定手法はソフトウェアのマニュアルに従い、全ての方法で同じ手法を用いた。μCTにおけるマウスの撮影も常に同じマニュアルを用いて行った。

ソフトウェアの使用手順の概要を下記に述べる。

Intage Realia 操作法：

「ファイル→インポートデータ→ファイルの種類：TIFF Files→開く」

µCT設定のスケーリング係数5でWL226で切歯がほぼ描出される。必要のない部位をトリミングし、「Shift+右クリック→表示→体積」として体積を測定した（図８）。



図８

断面積の測定法：

μCTのtif画像をIntage Realiaに読み込む。歯軸に対して垂直にして、ほぼ萌出部位で切断する（図９）。

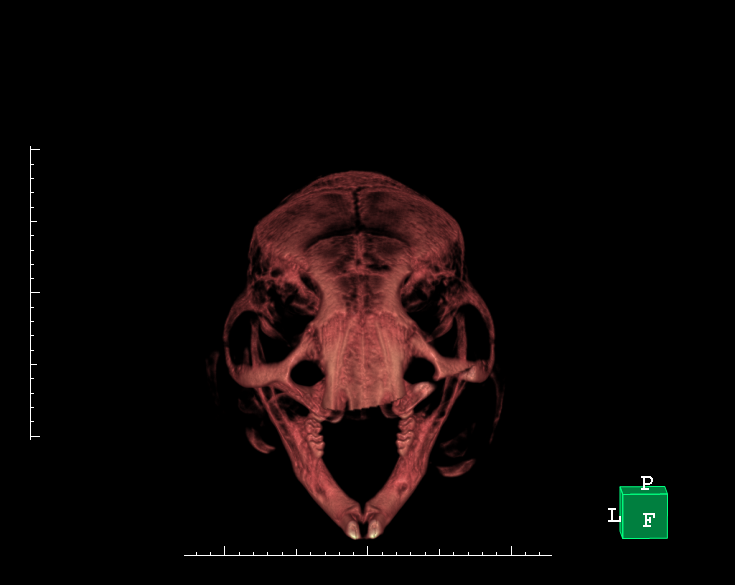


図９

ivpファイルにして保存する。volume playerに読み込み、.bmpファイルにして保存する。Image Jに読み込む。目盛の単位は1mmとする。「Split channels→green」 とした後、萌出部位の概形をとる（図１０）。



図１０

測定誤差について考察するため、*Bmp7*改変マウス(ICR)の右下顎切歯断面積（mm2）の測定を試行した。ImageJによる切歯の外形を２回トレースしてその面積を測定した。測定者１のデータとその回数別の平均値、不偏標準偏差、標準誤差を以下に示す（表６）。



表６

測定者１の１回目と２回目の測定値の相関を求めるため、散布図とピアソンの相関係数、

スペアマンの相関係数を求めた（図１１）。

図１１

測定者１のピアソンの相関係数は0.956、スペアマンの相関係数0.952であり、正の相関を認めた。

測定者１のWTのそれぞれのサンプルの測定値は以下の通りであった（図１２）。

図１２

測定者１のHetサンプルのそれぞれの測定値は以下の通りであった（図１３）。

図１３

測定者１のWTとHetのサンプルにおける2回の測定値の平均値と標準誤差は以下の通りであった（図１４）。

図１４

測定者１のIntraobserver variationを評価するため、遺伝子型別と測定回数別に断面積の測定値を比較するため、ノンパラメトリックの統計解析を行った。Mann-Whitney U-testを用いて、下記のp値を得た（表７）。

|  |  |
| --- | --- |
| WT1回目:Het1回目 | p値 0.0127 |
| WT2回目:Het2回目 | p値 0.00873 |
| WT1回目:Het2回目 | p値 0.00579 |
| WT2回目:Het1回目 | p値 0.0127 |

表７

ウィルコクソンの符号付順位和検定にて、下記のp値を得た（表８）。

|  |  |
| --- | --- |
| WT1:WT2 | p値　0.529 |
| Het1:Het2 | p値　0.375 |

表８

同一個体での測定間では有意差を認めず、遺伝型間では有意差を認めた。したがって、遺伝型ごとの差異よりも小さく、十分無視できる範囲ではないかと考えられた。

測定者２のWTとHetのサンプルにおける2回の測定値の平均値と不偏標準偏差と標準誤差は以下の通りであった（表９、図１５）。測定者１のデータも含めて表示した。棒グラフは平均値と標準誤差を示す。



表９

図１５

測定者２のIntraobserver error（観察者内測定誤差）を評価するため、遺伝子型別と測定回数別に断面積の測定値を比較するため、ノンパラメトリックの統計解析を行った。

Mann-Whitney U-testにて、下記のp値を得た（表１０）。

|  |  |
| --- | --- |
| WT1回目:Het1回目 | p値 0.00873 |
| WT2回目:Het2 | p値 0.00404 |
| WT1回目:Het2 | p値 0.0126 |
| WT2回目:Het1回目 | p値 0.00267 |

表１０

ウィルコクソンの符号付順位和検定にて、下記のp値を得た（表１１）。

|  |  |
| --- | --- |
| WT1回目:WT2回目 | p値　0.578 |
| Het1回目:Het2回目 | p値　0.0468 |

表１１

　遺伝子間では全て群の比較において有意差が生じていた。また、測定者2はHet間で有意差が生じていた。１回目と２回目の測定において大きい測定誤差が生じていたことが予測される。

　Interobserver error（観察者間測定誤差）の評価を行なった。まず、測定者と測定回数別に相関係数を用いて評価した（表１２）。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | ピアソンの相関係数 | スペアマンの相関係数 |
| 測定者1,1回目 vs 測定者2,1回目 | 0.691 | 0.686 |
| 測定者1,1回目 vs 測定者2,2回目 | 0.741 | 0.723 |
| 測定者1,2回目 vs 測定者2,1回目 | 0.719 | 0.715 |
| 測定者1,2回目 vs 測定者2,2回目 | 0.785 | 0.701 |

表１２

次に測定者１と測定者２の同じ測定回数における遺伝子型別の下顎切歯の断面積の比較を、ノンパラメトリックによる統計解析を用いて行なった。その結果は次の通りである。

ウィルコクソンの符合付順位和検定にて、下記のp値を得た（表１３）。

|  |  |
| --- | --- |
| WT測定者１、１回目: WT測定者２、１回目 | p値0.937 |
| WT測定者１、２回目:WT測定者２、２回目 | p値0.296 |
| Het測定者１、１回目: Het測定者２、１回目 | p値0.0156 |
| Het測定者１、２回目: Het測定者２、２回目 | p値0.107 |

表１３

Hetの１回目の測定において測定者１と測定者２で有意差が生じた。測定者間で大きい測定誤差が生じていることが考えられた。

測定者内の信頼性を調べるため、級内相関係数を用いた(表１４)。パラメトリックの測定値が要求されるため、遺伝子型別に示した。フリーソフトウェアRのpsychパッケージを用いた。



表１４

ICC(1.1)は1人の評価者が複数回評価した時の評価者内信頼性、ICC(1,2)は 1人の評価者が複数回評価した時の評価平均の信頼性を示す。測定者１、２両者とも級内相関係数は高い値であり、信頼性が高いといえる。

測定者間の信頼性を調べるため、級内相関係数を用いた(表１５)。



表１５

ICC(3,1)は特定の２人の評価者が1回評価した時の評価者間信頼性、ICC(3,2)は特定の２人の評価者が1回評価した時の評価平均の信頼性を示す。WTの１回目の測定では測定者間の級内相関係数は負の相関となっており、また、WTの測定では測定者間の級内相関係数は低い値を示しており、信頼性が低いことがわかった。一方、Hetの測定では測定者間の級内相関係数は高い値を示しており、信頼性が高いことがわかった。

今回測定者は一人で行ったが、測定者を複数設ける方が、測定者の主観的な判断などがデータに影響する可能性を排除できると思われる。遺伝子型による歯の大きさの違いは、測定者間の測定誤差を超えるものであると解釈できた。

複数人の測定を行うことで主観的な要素を除く代わりに、下顎切歯の体積、断面積の測定および下顎大臼歯の投影面積の測定は、遺伝子型の情報を隠して、盲検的に行った。

　主観的な要素を除くために、測定者を複数設けることや、複数回の測定、測定者内測定者間における信頼性を評価することに留意すべきであった。

参考文献

Kazuo Yonenobu, Kuniyosi Abumi, Kensei Nagata, Eiji Taketomi, and Kazumasa Ueyama: Interobserver and Intraobserver Reliability of the Japanese Orthopaedic Association Scoring System for Evaluation of Cervical Compression Myelopathy, SPINE 2001, Volume 26, Number 17, 1890–1895.

Kavanagh KD, Evans AR, Jernvall J et. al.: Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. Nature 2007, 449, 427–432.

Ito H, Matsuno T, Hirayama T, Tanino H, Yamanaka Y, Minami A: Three-dimensional computed tomography analysis of non-osteoarthritic adult acetabular dysplasia. Skeletal radiology 2009, 38(2):131-139.

4.  *Bmp7*+/-と*Usag-1*-/-が相加的に歯が大きくなった理由

2つの遺伝子が互いに相互作用する遺伝子は、同一かパラレルな生化学経路で機能することがある。2つの遺伝子がパラレルな生化学経路で機能する場合、一方の遺伝子変異が組織障害を起こし、第二の変異がさらに組織を障害することがあり、両遺伝子が相加的に作用して、より重度の異常が生じることになる。１つの生化学経路は細胞内あるいは細胞間で作用しうるので、問題となっている遺伝子がたとえ共発現していなくても遺伝子間相互作用が無いとは言えない。

2つの遺伝子は上顎の過剰歯の発生においては拮抗的に作用していた（Kiso et.al., PLOS ONE, 2014）ため、大きさに関しても拮抗的に作用するものと予想されたが、Figure 2の第二世代の下顎切歯の解析では歯の大きさに関して相加的に作用している傾向が認められ、*Usag-1*-/-マウスにおいて過剰歯の歯の大きさに関しても相加的に作用していた。上顎切歯部では100%の発生率が認められるが、下顎切歯部では44%の発生率であり(Murashima-Suginami et.al., BBRC, 2007)、また、上顎と下顎では*Bmp7*と*Usag-1*遺伝子の発現部位に違いを認めた（Kiso et.al., PLOS ONE, 2014）。*Usag-1*遺伝子の下流に存在するシグナル伝達経路として、*Bmp*シグナリングの他に、*Wnt*シグナリングの存在も考慮する必要がある。上顎と下顎の歯の発生に関わる遺伝子の発現が異なる例を挙げる。KOマウスによる解析において、ホメオボックス遺伝子*Dlx-1,2*はマウスにおいて上顎臼歯のみの形成に関わっており(Bethan L. et.al., Development, 1997) 、*Activin βA*はマウスにおいて切歯と下顎大臼歯の形成に関わっているとの報告がある (Christine A. Ferguson et.al., Genes＆Development, 2017) 。従って、上顎と下顎の過剰歯の発生に関わる遺伝子の働きが異なることが考えられた。

表現型に対する影響に対して、代償性の遺伝子発現上昇が影響している可能性がある。変異の組み合わせにおける関連遺伝子の発現量も追加して検索すべきと考えられる。

Figure 4J,Kにおいて胎生15日目の下顎切歯におけるBrdU染色の結果から、*Bmp7*+/-では唇側・舌側のCervical loopの細胞増殖率が増加しており、*Usag-1*-/-では、歯乳頭のLabeling index(細胞増殖率)が増加しており、それぞれの遺伝子の発現量の低下による歯の大きさの増大に関わる作用機序が異なることを意味していると考えられた。また、Figure 1において*Bmp7*と*Usag-1*は発現部位が異なる部位がある。*Usag-1*ではエナメル結節を除く上皮に発現しており、*Bmp7*ではエナメル結節にも発現している。

2つの遺伝子の機能は重複しておらず、異なった作用機序を有していることが大きさに関して相加的に作用した理由であると考えられた。

参考文献：

Kiso H, Takahashi K, Saito K, Togo Y, Tsukamoto H, Huang B, Sugai M, Shimizu A, Tabata Y, Economides AN et al: Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formations. PloS one 2014, 9(5): e96938.

Murashima-Suginami A, Takahashi K, Sakata T, Tsukamoto H, Sugai M, Yanagita M, Shimizu A, Sakurai T, Slavkin HC, Bessho K: Enhanced BMP signaling results in supernumerary tooth formation in USAG-1 deficient mouse. Biochemical and biophysical research communications 2008, 369(4):1012-1016.

Bethan L. Thomas, Abigail S. Tucker1, Mensheng Qiu, Christine A. Ferguson, Zoë Hardcastle, John L. R. Rubenstein and Paul T. Sharpe: Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. Development 1997, 124, 4811-4818.

Christine A. Ferguson, Abigail S. Tucker, Lars Christensen, Anthony L. Lau, Martin M. Matzuk and Paul T. Sharpe: Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition 2017, 12:2636-2649.

5. *Bmp7+/-*, *Usag-1+/-*がKOと異なる表現型になった理由

　HetとKOの表現型が異なる現象は、複雑な種々のメカニズムが関わっているものと考えられる。

Figure.2において*Bmp7*+/-マウスでは歯の大きさが増大していた。*Bmp7*-/-では*Bmp7*コンディショナルノックアウトマウスにおいて、上顎切歯の消失、低形成、第一大臼歯の変形や消失が報告されている(Zouvelou V, J Exp Zool B, 2009)。また、Figure 2において*Usag-1*+/-マウスでは歯の大きさが縮小し、*Usag-1*-/-マウスでは増大していた。

*Bmp7*+/-マウスと*Usag-1*-/-マウスの歯の状態を表す用語としては、ハプロ不全(Haploinsufficiency)が挙げられる。一対の相同染色体のうち、一方の遺伝子の不活性化で起こる表現型の変異で遺伝子産物（タンパク質やRNA）の量的不足に起因するものである。

胎生期における歯胚への*Wnt*のGain-of-function、Loss-of-functionによって歯が縮小する報告がある(Shaker and sharpe et.al., JDR, 2000) (Cai, Cell Tissue Res, et.al, 2011)。歯の大きさの決定には関連遺伝子の歯の発達において、適切な発現量が必要なことがわかる。

現時点では、この現象に対して適切な説明となるものは見当たらないが、下記の3つの解析法を用いることで、その作用機序解明していく可能性があると考えた。

第一に、*Usag-1*は*Bmp*シグナリングと*Wnt*シグナリングを抑制しているが、HetとKOでそれぞれのシグナリングの亢進程度が異なる可能性がある。下流のp-Smadやβカテニンなどを免疫染色などで評価して、その作用の違いを調査する必要があると思われる。*Bmp*は転写因子Smadを介したシグナル伝達の他、MAPK関連のシグナル伝達、PI3K/Aktタンパク質のシグナル伝達が報告されている。*Wnt*のシグナル伝達機構はβカテニン経路の他、PCP（planner cell polarity）制御経路とCa2+シグナル経路が存在する。*Bmp*のSmadシグナリング、*Wnt*のβカテニン経路以外の経路の活性化が関わっている可能性がある。

次に、HetとKOでは下流の遺伝子が異なる可能性がある。マウスのゲノムが同じ生物学的プロセスを共に制御する類縁遺伝子のコピーを多数持っている。したがって、ある遺伝子ファミリーの一つのメンバーが変異すると、他のメンバーが対照性に遺伝子発現上昇が生じ、遺伝子変異の影響を補償することがある。歯胚からcDNAを採取して、下流の遺伝子を検索することを検討している。胎生期15日目の歯胚の上皮と間葉からcDNAを作成し、HetとKOで高分解ゲル電気泳動を行い、ディファレンシャルディスプレイ（並べて電気泳動して対照資料と相当しないバンドのDNA配列を決めて遺伝子を同定する）を用いて、遺伝子の発現の違いを見つけ、クローニングとシークエンシング、DNAマイクロアレイや超高速シークエンシングを用いて下流の遺伝子の発現の変化を解析することを想定している。

最後に、*Usag-1*は*Shh*と*Wnt*とネガティブフィードバックループを形成し、*Wnt*がActivator、*Shh*がMediator、*Usag-1*がInhibitorとなって歯の形態形成を制御している (Sung-Won Cho et. al, Development, 2011)という報告があり、細胞外分泌蛋白であるUSAG-1やBMP7に関わるシグナル伝達は多変数による複数のフィードバックループなどが存在し、空間的なパターンなど複雑な形態形成がなされていることを考慮する必要があると思われる。

　現時点では、HetとKOにおいて歯の大きさの変化が生じる現象に関わる分子機序は明らかではないが、その理由は以上の解析法の中に解明すべき機序が含まれていると考える。

参考文献:

Zouvelou V, Luder HU, Mitsiadis TA, Graf D: Deletion of BMP7 affects the development of bones, teeth, and other ectodermal appendages of the orofacial complex. Journal of experimental zoology Part B, Molecular and developmental evolution 2009, 312B(4):361-374.

Sarkar L, Sharpe PT: Inhibition of Wnt signaling by exogenous Mfrzb1 protein affects molar tooth size. Journal of dental research 2000, 79(4):920-925.

Cai J, Mutoh N, Shin JO, Tani-Ishii N, Ohshima H, Cho SW, Jung HS: Wnt5a plays a crucial role in determining tooth size during murine tooth development. Cell and tissue research 2011, 345(3):367-377.

Cho SW, Kwak S, Woolley TE, Lee MJ, Kim EJ, Baker RE, Kim HJ, Shin JS, Tickle C, Maini PK et al: Interactions between Shh, Sostdc1 and Wnt signaling and a new feedback loop for spatial patterning of the teeth. Development 2011, 138(9):1807-1816.