

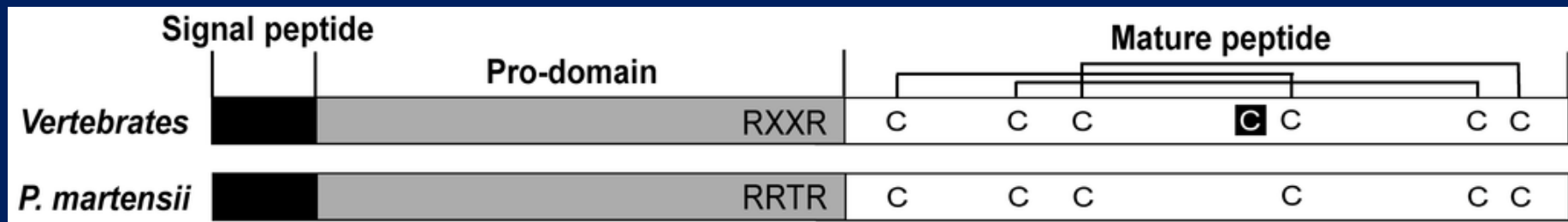
BMP7とUSAG-1の発現量減少は マウスの歯の形態形成に影響を 与える

歯科口腔外科
齋藤 和幸

骨形成タンパク質 BMP7

Bone Morphogenetic Protein7

BMP7 は35kDaのホモ二量体であり、転写因子Smadを介したシグナル伝達、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。

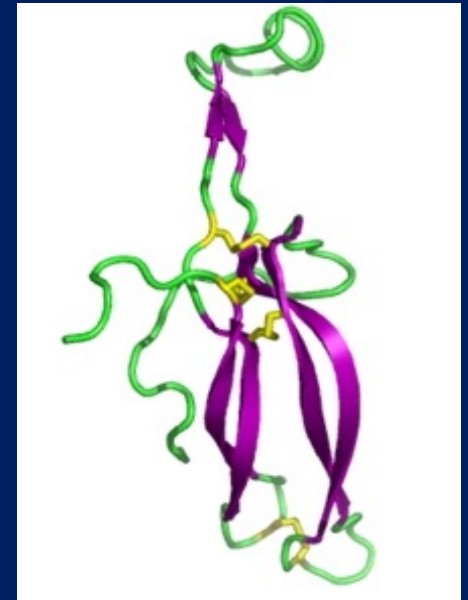


USAG-1

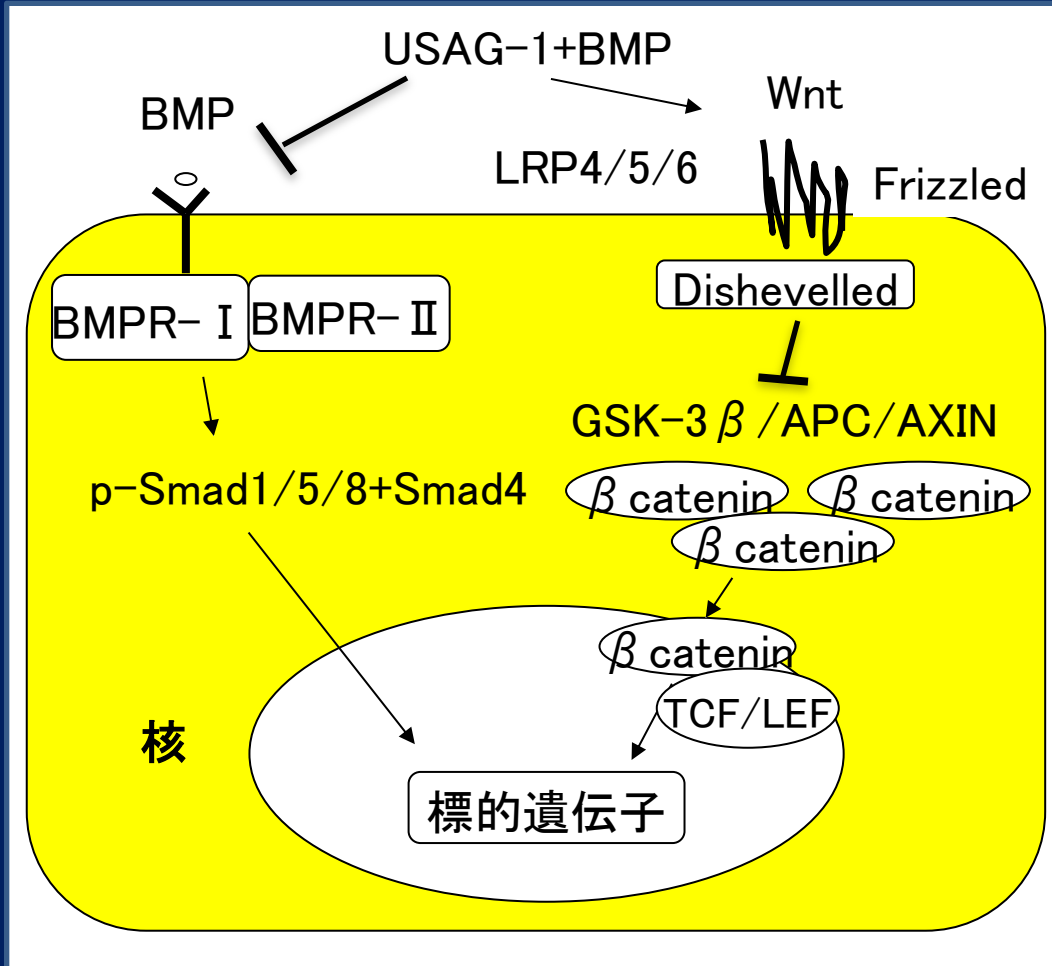
Uterine sensitization-associated gene-1

別名 sostdc1(sclerostin domain-containing protein 1), ectodin, Wise

USAG-1 は単量体として機能するグリコシル化された28-30kDaの分泌蛋白である。USAG-1はWntの共受容体 low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5 とLRP6に結合して、Wntのシグナル伝達を抑制する。歯の形態形成において、USAG-1はLRP4に結合して、LRP4はBMPシグナル伝達と古典的なWntシグナル伝達を調節している。

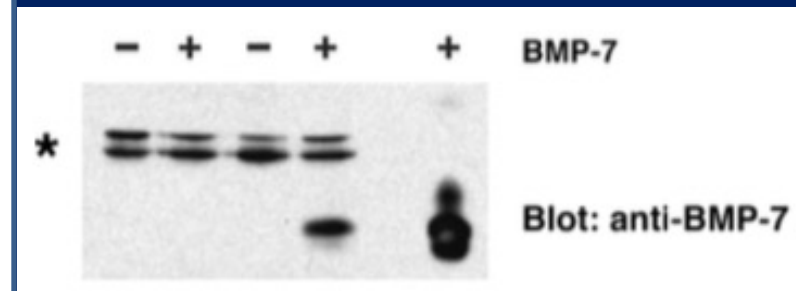


BMP7 と拮抗分子USAG-1



pEF4 mock vectorあるいはpEF4-hUSAG1-Flag を遺伝子導入したアフリカミドリザル腎臓由来COS7細胞株を使用しanti-Flag M2 antibody affinity gelで精製したタンパクを用いた免疫沈降法

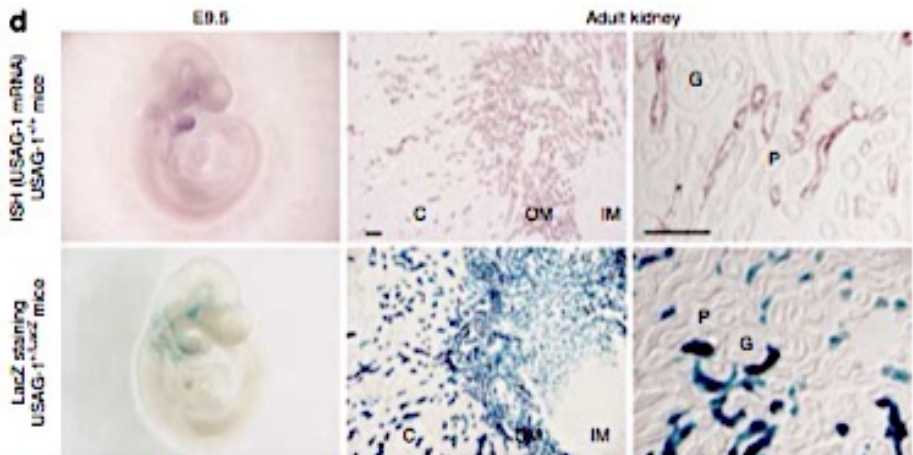
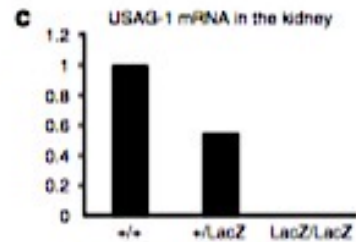
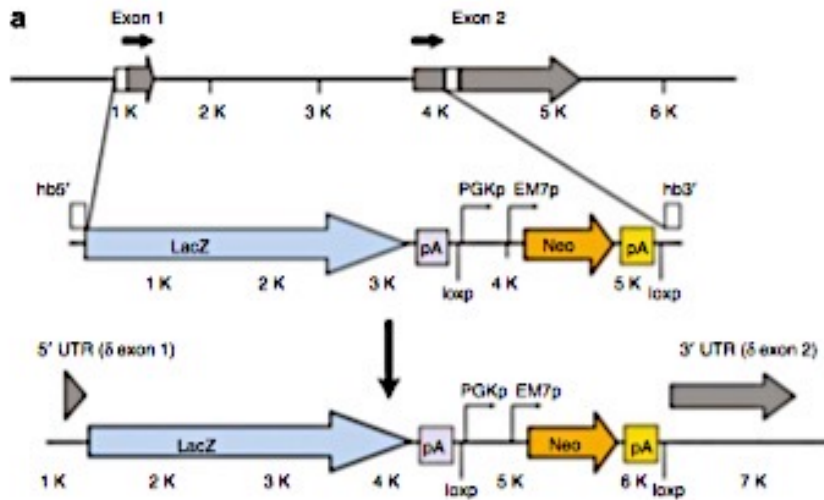
IP: anti-Flag					
1	2	3	4	5	
+	+	-	-	-	Mock
-	-	+	+	-	pEF4-hUSAG1-Flag



Yanagita, BBRC, 2004

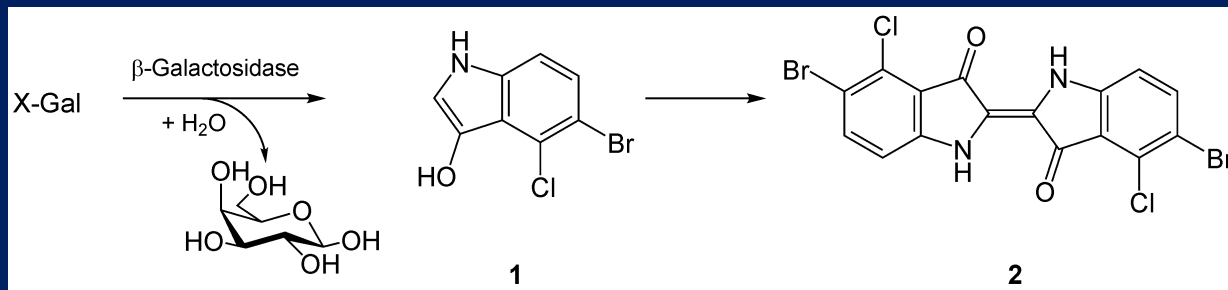
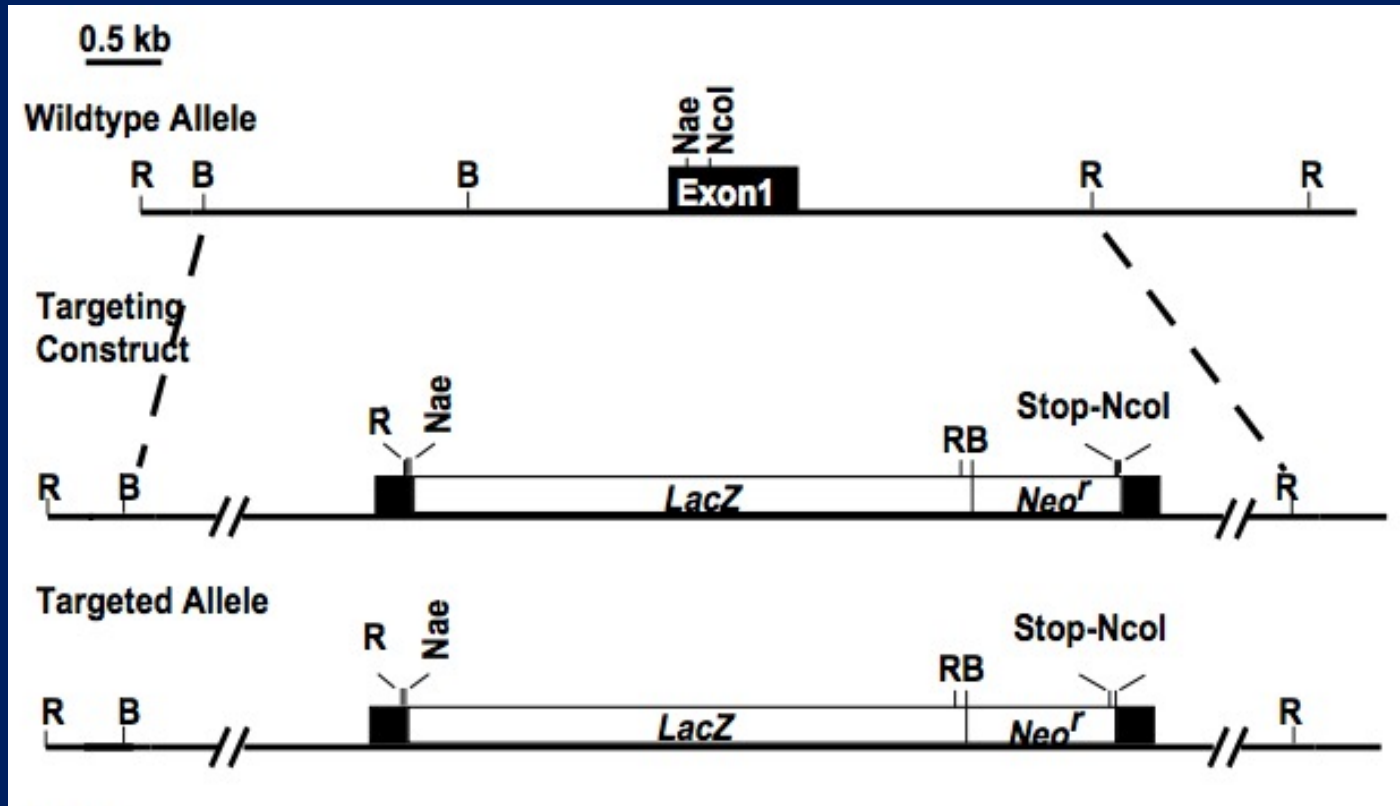
Usag-1とBmp7は遠位尿細管での発現部位が類似しており、また免疫沈降法にてそれらの結合が確認されている。

Usag-1 LacZ ノックインマウス



Tanaka M et.al, Kidney Int. 2008

Bmp7 LacZノックインマウス

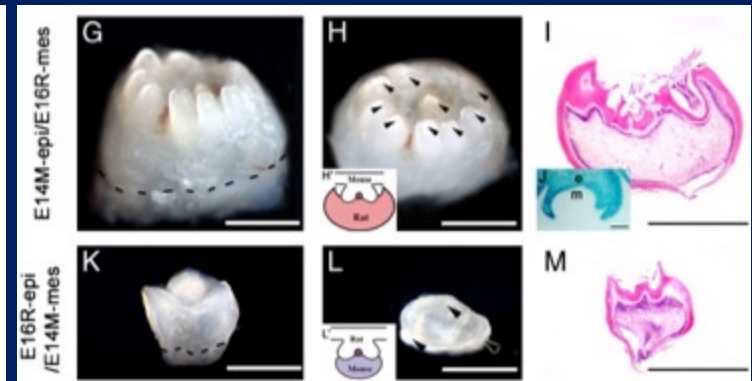
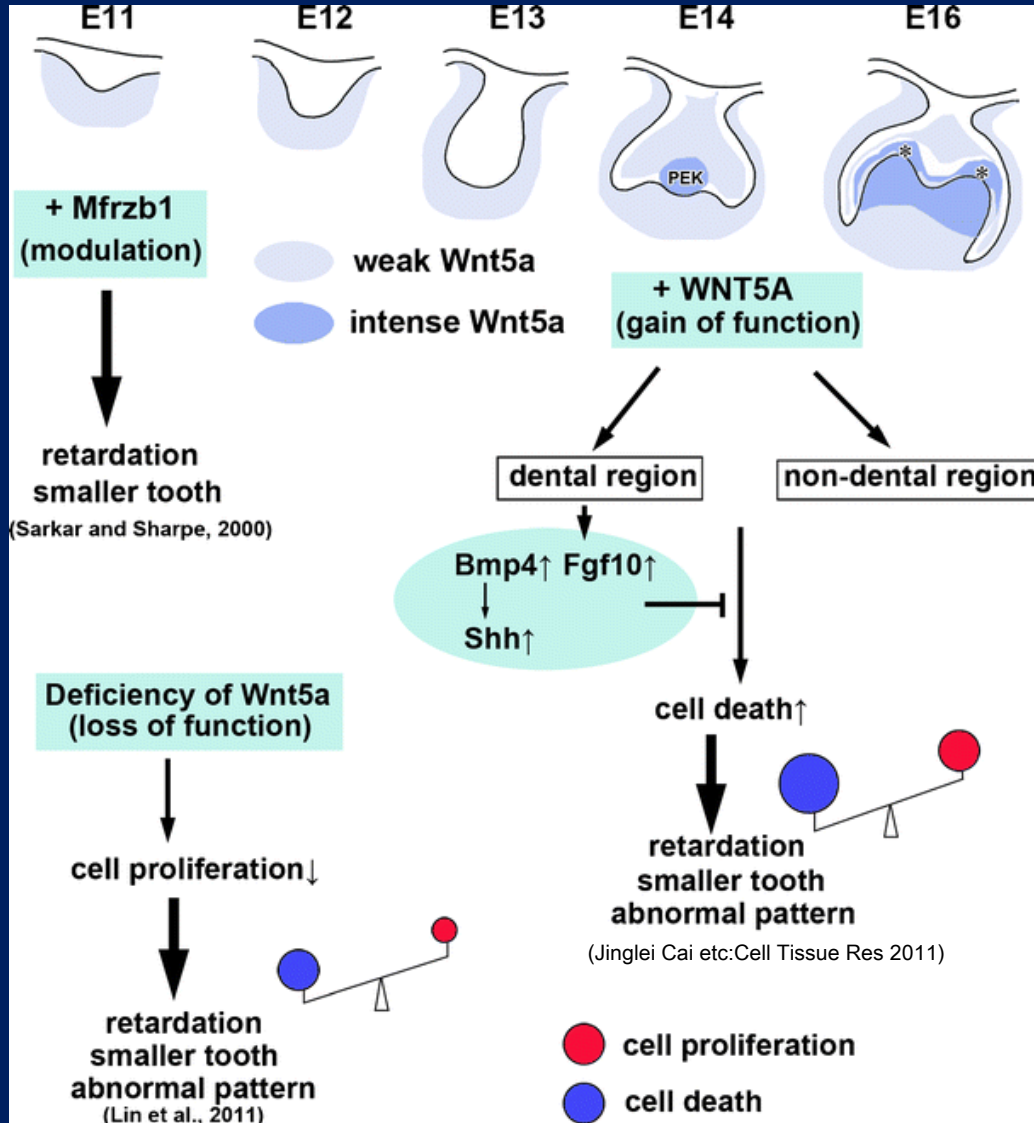


歯の大きさに関わる遺伝子 *Wnt*

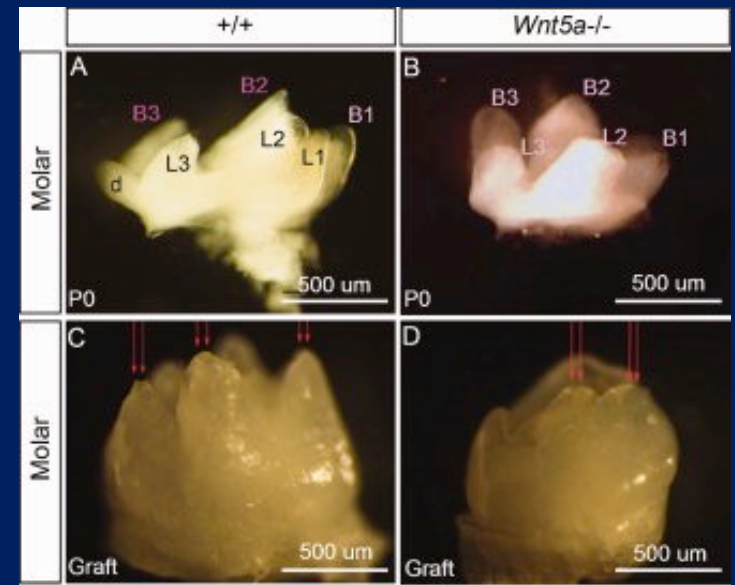
bud stage

cap stage bell stage

Bar: 1mm



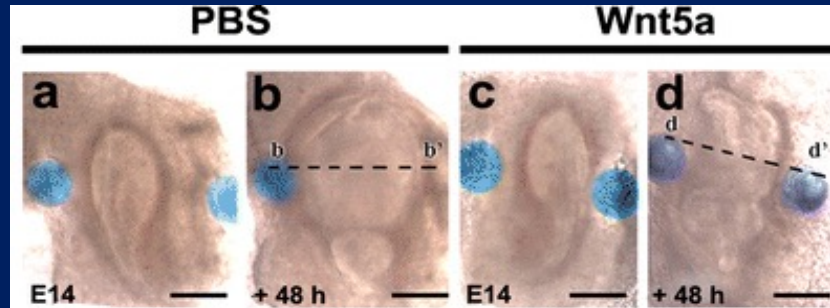
(Jinglei Cai etc:Cell Tissue Res 2011)



(Lin M etc Dev Dyn 2011)

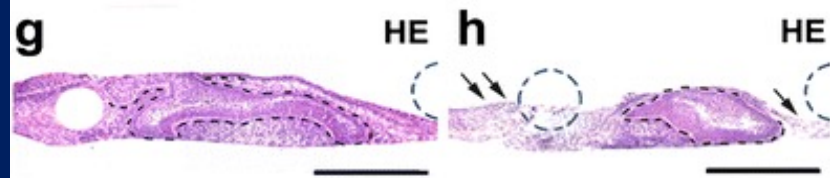
Wnt5aは歯胚周囲の細胞死を引き起こし歯胚の発達を妨げる

ビーズ実験

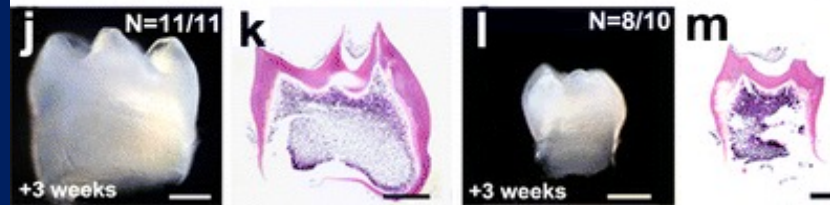


Bar:250μm

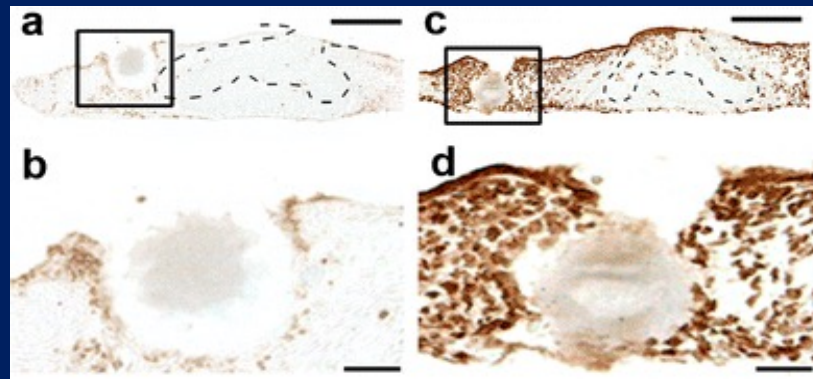
器官培養
2日後



腎臓被膜下
移植3週間後

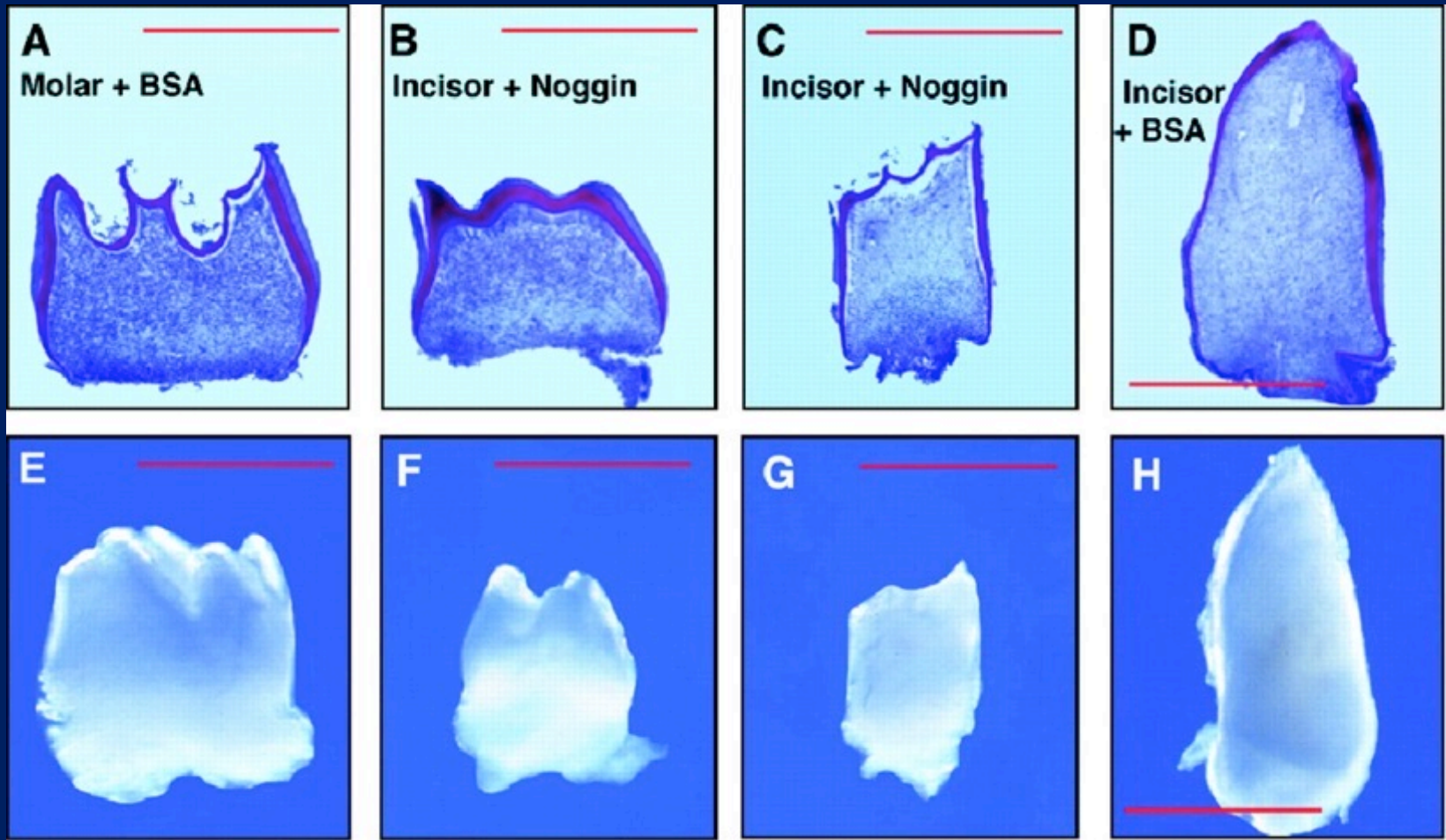


器官培養
2日後の
TUNEL染色



(Jinglei Cai etc:Cell Tissue Res 2011)

歯の大きさに関わる遺伝子 *Bmp*

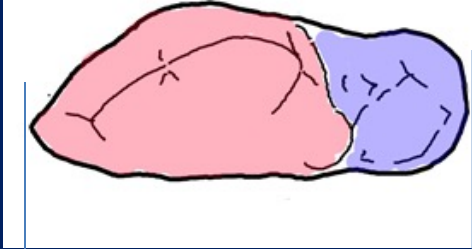


Bar: 500 μ m

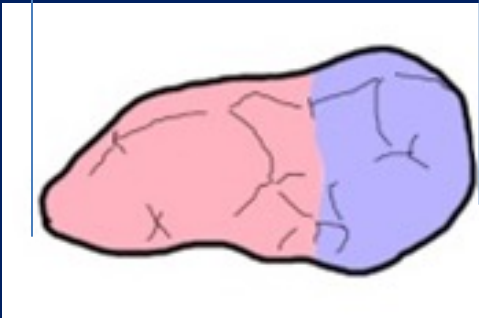
(Sharpe etc:Science 1998)

Inhibitory cascade (臼歯の相対サイズ)と臼歯形態の形態的統合(多面発現的効果) 食肉目において食性適応で進化するふたつの形質

肉食性

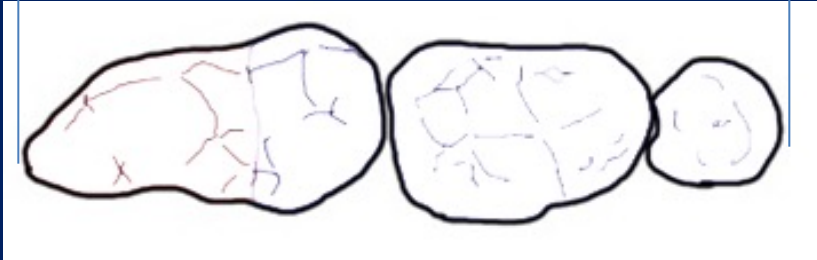
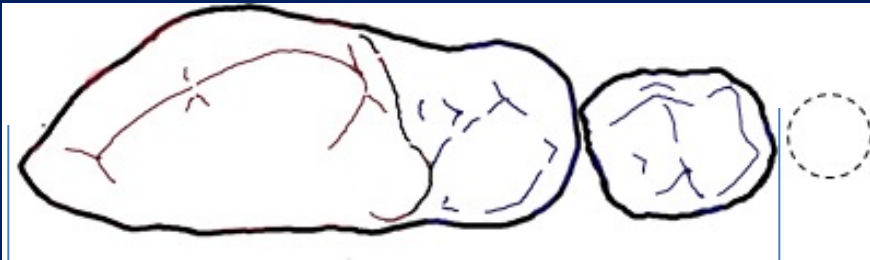


雑食性
昆虫食性



M₁ トリゴニッド/タロニッドの比率

Popowics(2003)

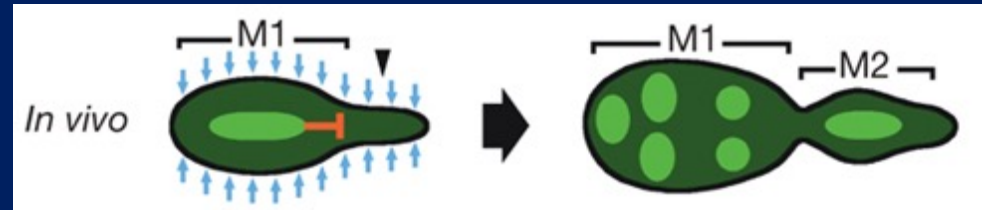
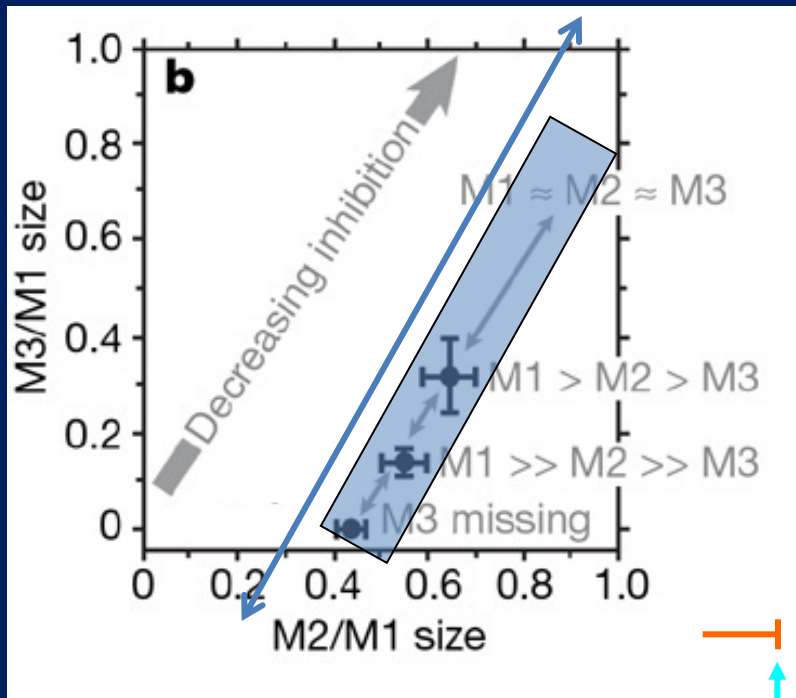


M₁/ M₂/ M₃ の比率

Asahara(2013)

下顎臼歯の相対サイズを決定する発生モデル Inhibitory cascade model (ICモデル)

High activation
Low inhibition



— Inhibitors from M1 (*ectodin*, *Bmp3* and *follistatin*)
↑ Activators from mesenchyme (*Bmp4*, *Activin βA*)

Low activation

High inhibition

(Kavanagh, Nature, 2007)

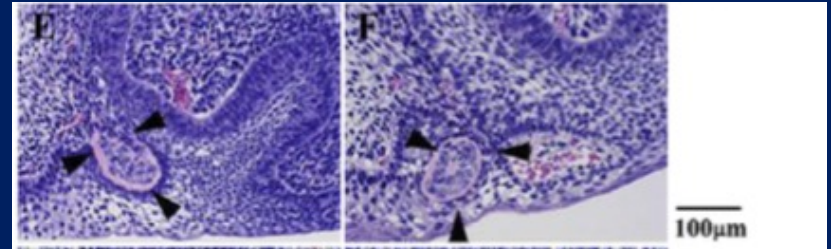
USAG-1KOマウスの切歯 は過剰歯が発生する

下顎切歯

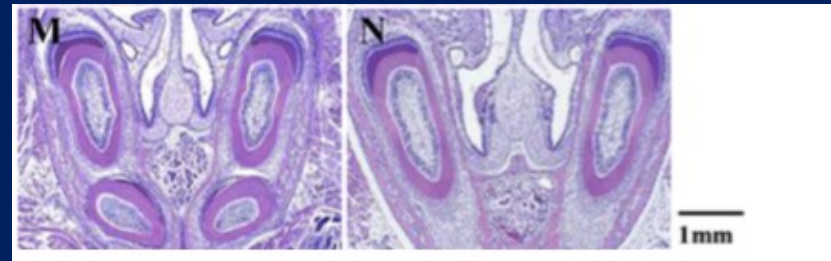


上顎切歯 KO WT

E15



P0

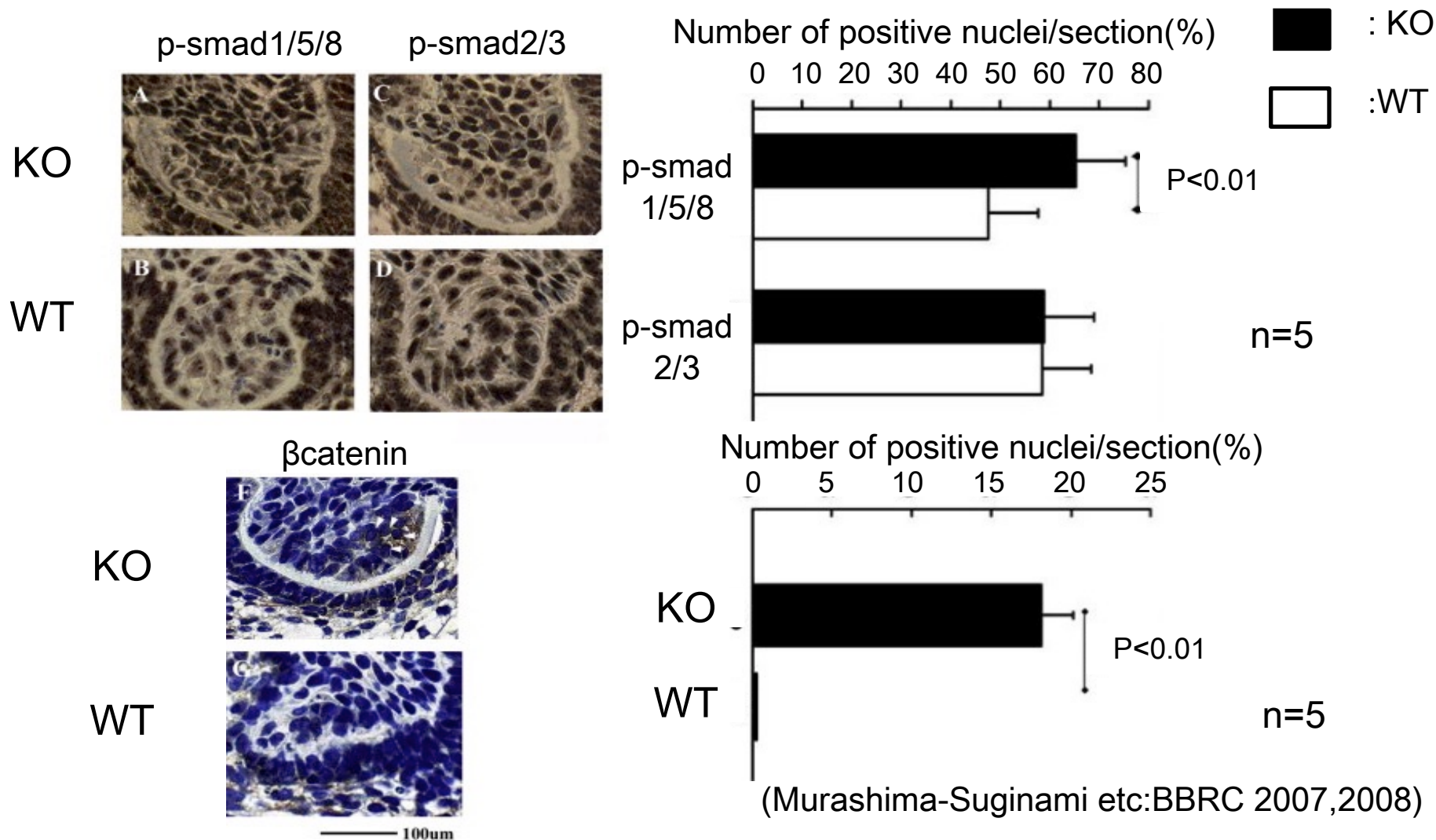


第一生歯

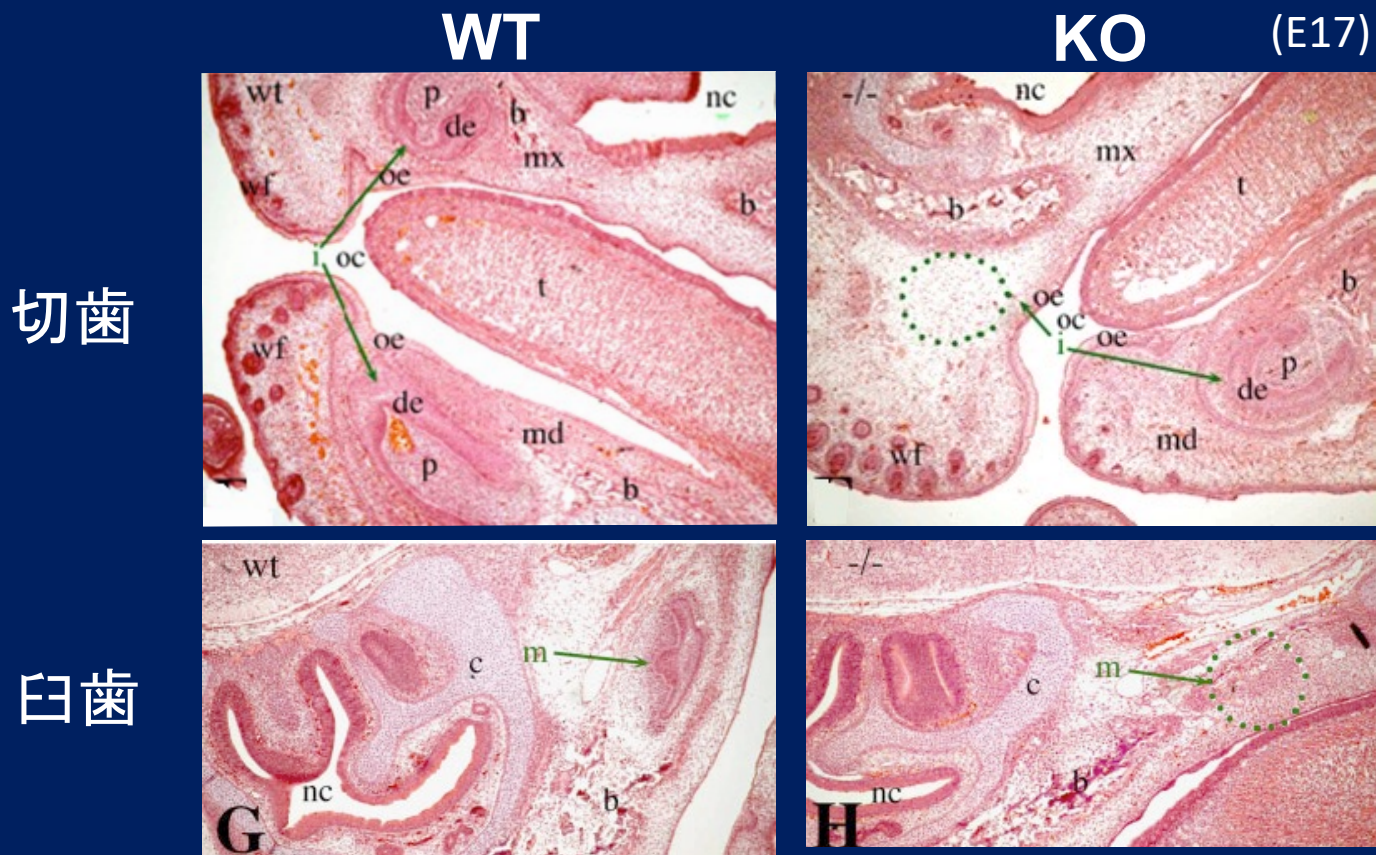
第二生歯

*Usag-1*KOマウスでは胎生15日目の歯原性間葉に p-smadと核移行した β -cateninの増加を認める

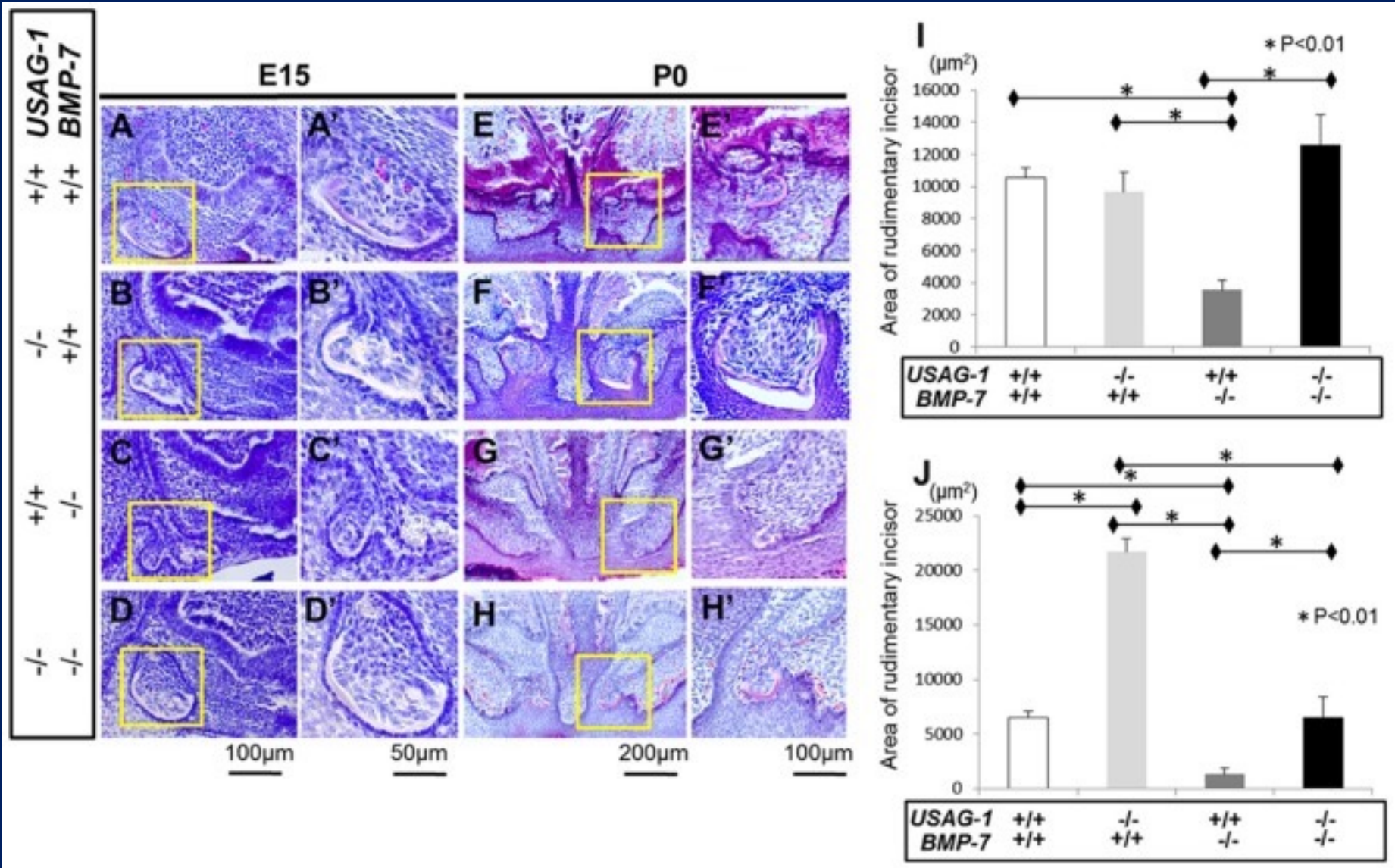
E15 上顎切歯



BMP-7 conditional null マウスにおける 上顎切歯と臼歯の欠損



Usag-1/Bmp 改変マウスの上顎過剰切歯



X-gal染色 (Whole mount)

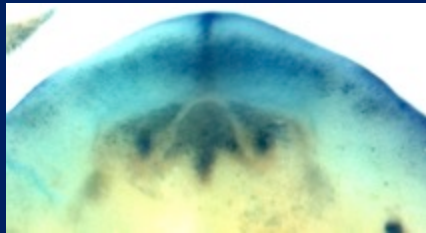
Bmp7/LacZ Het *Usag1*/LacZ Het

E13

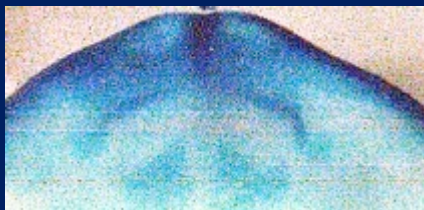
E14

E15

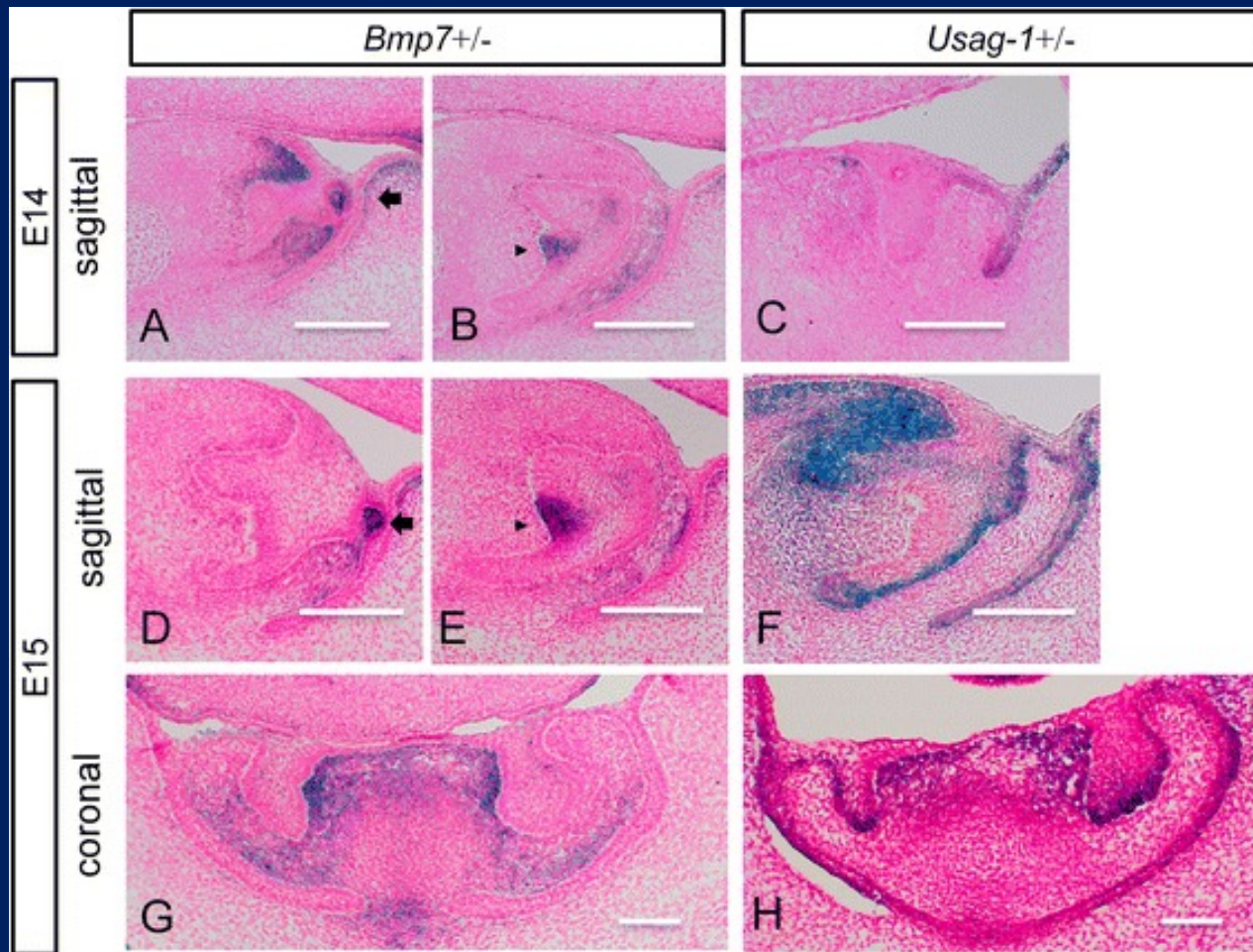
Bmp7



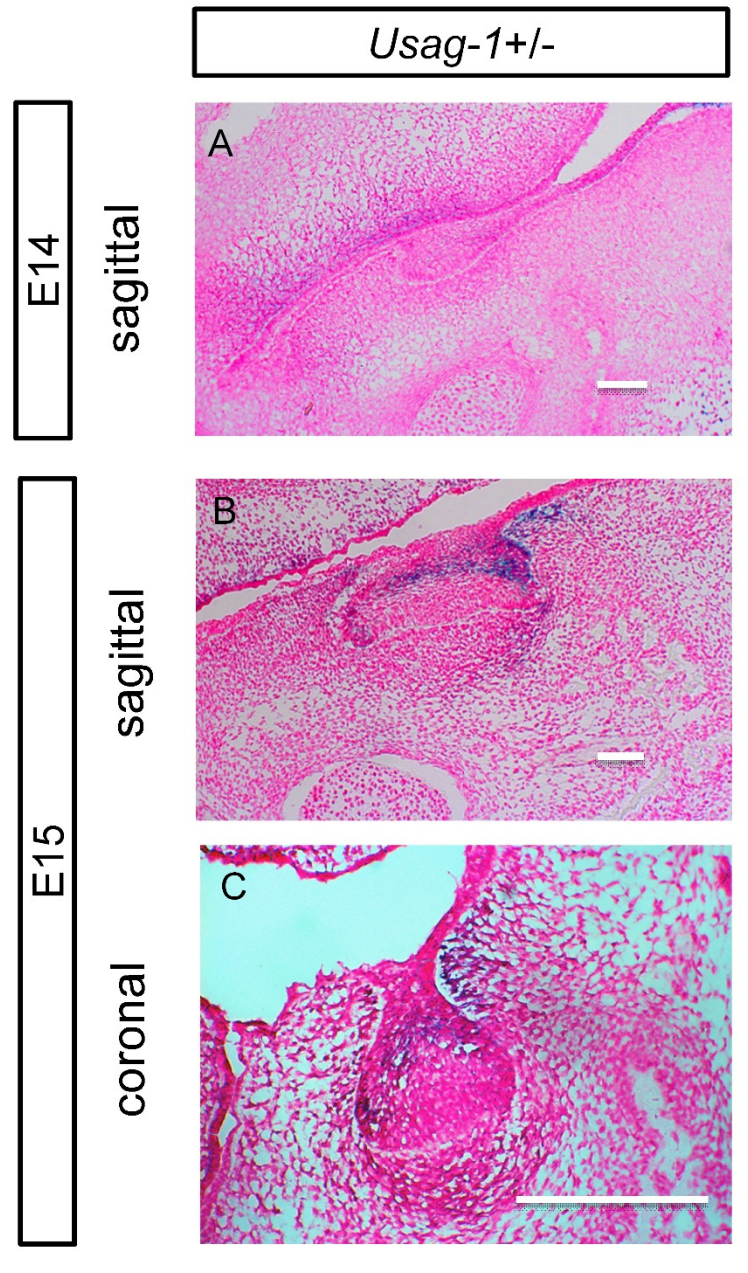
Usag-1



胎生14, 15日目における*Bmp7*^{+/-} (ICR) と*Usag-1*^{+/-} (C57BL/6) マウスの下顎切歯の*Bmp7*と*Usag-1*の発現



胎生14,15日目における
Usag-1^{+/-} (C57BL/6)
マウスの下顎臼歯の
*Usag-1*の発現.



仮説

WNT5aと同様に歯胚周囲の間葉に
発現するBMP7とその拮抗分子
USAG-1は歯の発生過程において、
歯の形態形成、大きさの決定に重
要な役割を果たしている。

材料と方法

マウスの系統:

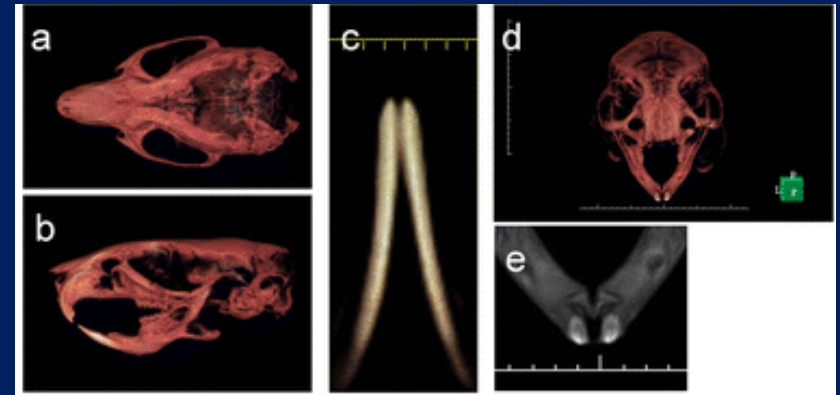
USAG-1^{LacZ}/LacZ(C57BL/6)

BMP-7^{+/-}/LacZ(ICR):KOは胎生致死

それらを交配した第二世代

方法:

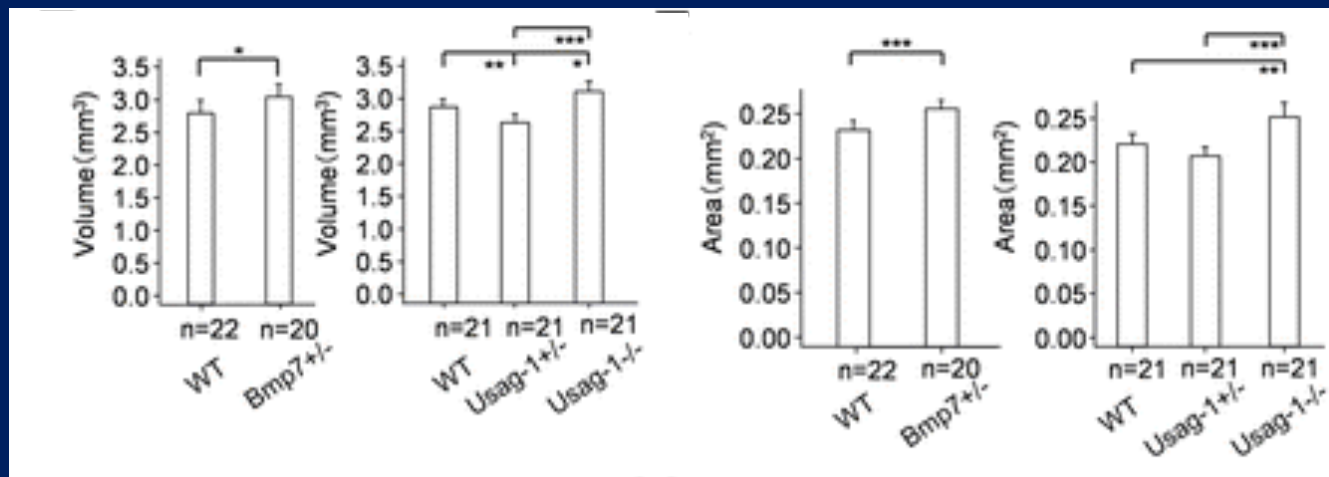
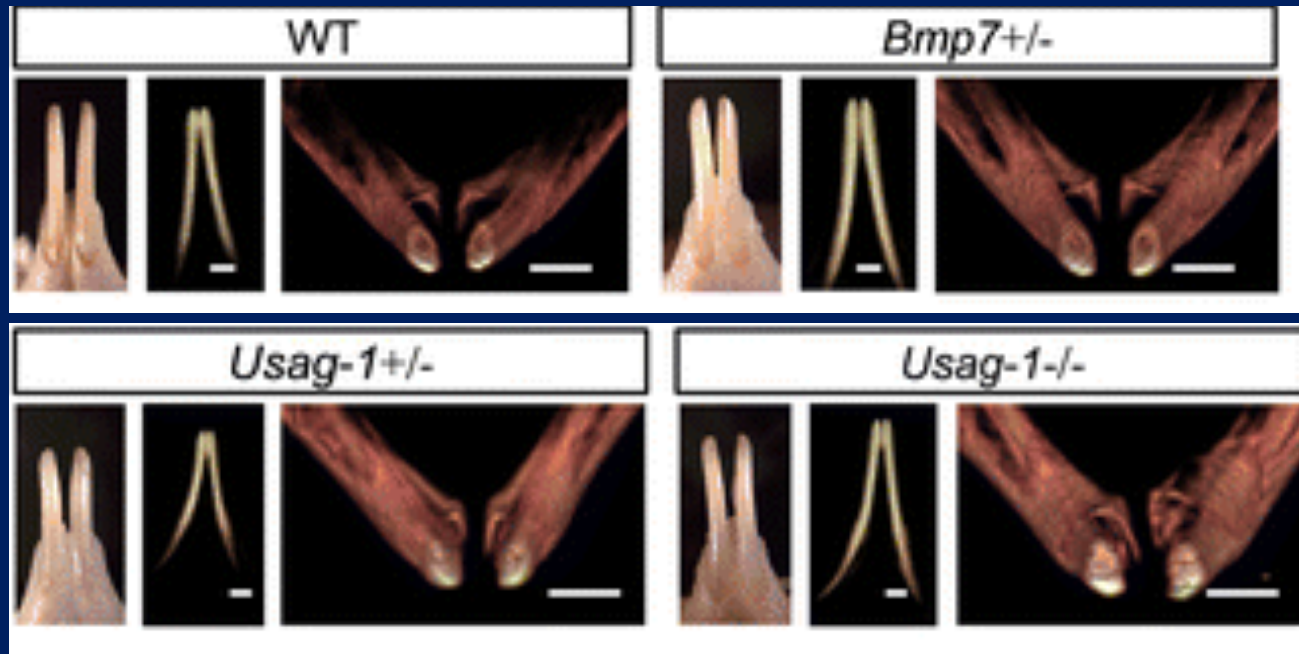
出生後マウスの頭部をマイクロCTにて撮影し、CYBERNET社のINTAGE Realiaにて三次元構築を行い(Hiroshi Ito etc :Skeletal Rdiol,2009)、下顎切歯を抽出し、体積測定を行った。ImageJを用いて歯軸に直交する面で舌側歯槽骨の最上点の部位にて断面積を求めた。



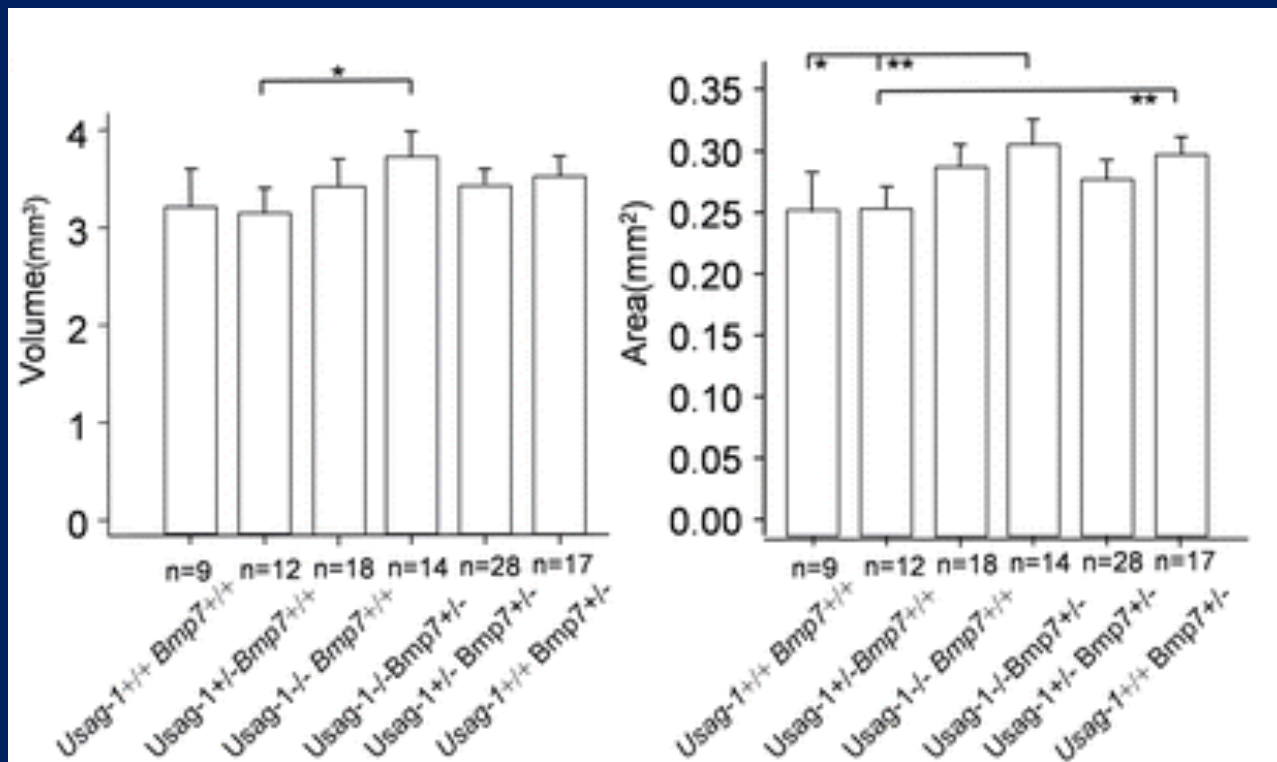
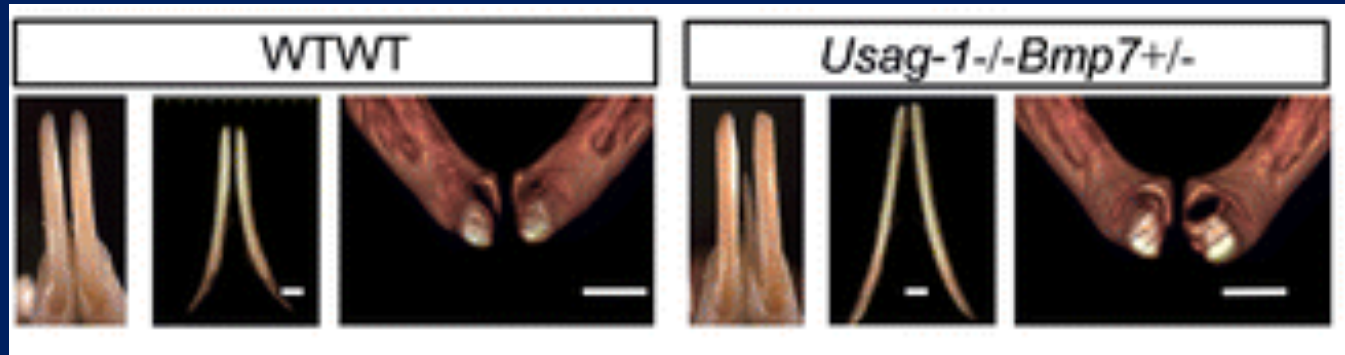
Saito et al. BMC Developmental Biology (2016)

ImageJを用いて出生後マウスの下顎臼歯咬合面の投影面積を測定した。胎生15日目の下顎切歯のBrdU染色を行い、部位別のLabeling Indexを測定した。アポトーシスを観察するため、TUNEL染色を行った。

出生後マウスの切歯の表現型解析



出生後F2マウスの切歯の表現型解析



遺伝子型と下顎切歯の体積と断面 積を解析した一般化線形モデル

	体積				断面積			
	Estimate	Std.Error	T value	P value	Estimate	Std.Error	T value	P value
Usag-1+/-	-0.08545	0.11291	-0.757	0.45107	-0.012964	0.008759	-1.480	0.142169
Usag-1-/-	0.20793	0.12003	1.732	0.08651	0.019976	0.009311	2.145	0.034498
Bmp7+/-	0.29578	0.09514	3.109	0.00249	0.027771	0.007380	3.763	0.000292

過剰歯を有する患者は歯が大きい

過剰歯を有する38人の男性と21人の女性のヨーロッパ人と同じ男女構成の対照群を用いて調査した。

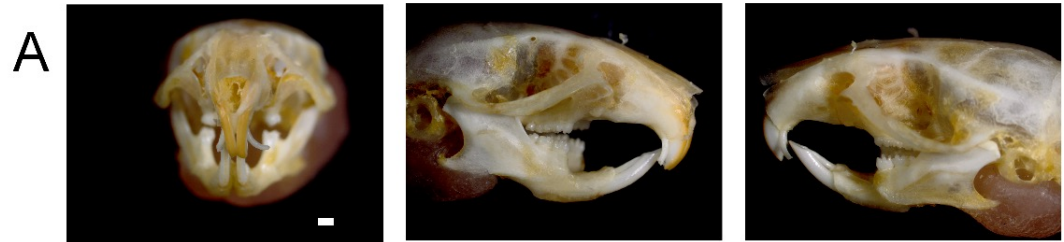
A.H.Brook et.al, AOB, 2009

過剰歯を有する*Usag-1*KOマウスでは歯が大きくなる現象に類似した現象である。

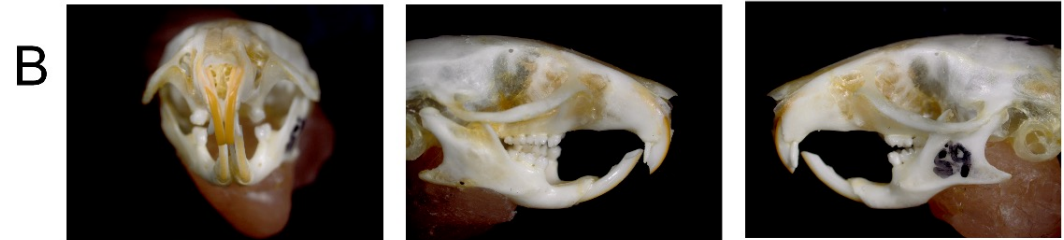
歯種	対照群	過剰歯を有する患者群
17 27	9.4	9.54
16 26	9.73	9.87
15 25	6.34	6.44
14 24	6.7	6.82
13 23	7.57	7.79
12 22	6.79	6.97
11 21	8.69	8.83
37 47	9.81	10.4
36 46	10.76	10.76
35 45	6.74	7.13*
34 44	6.96	7.08
33 43	6.57	6.78
32 42	5.73	5.71
31 41	5.19	5.29

Usag-1^{-/-} (C57BL/6) mice と *Usag-1*^{-/-} *Bmp7*^{+/-} (F₂) マウスにみられた不正咬合

Usag-1^{-/-}
正常咬合



Usag-1^{-/-} *Bmp7*^{+/-}
正常咬合



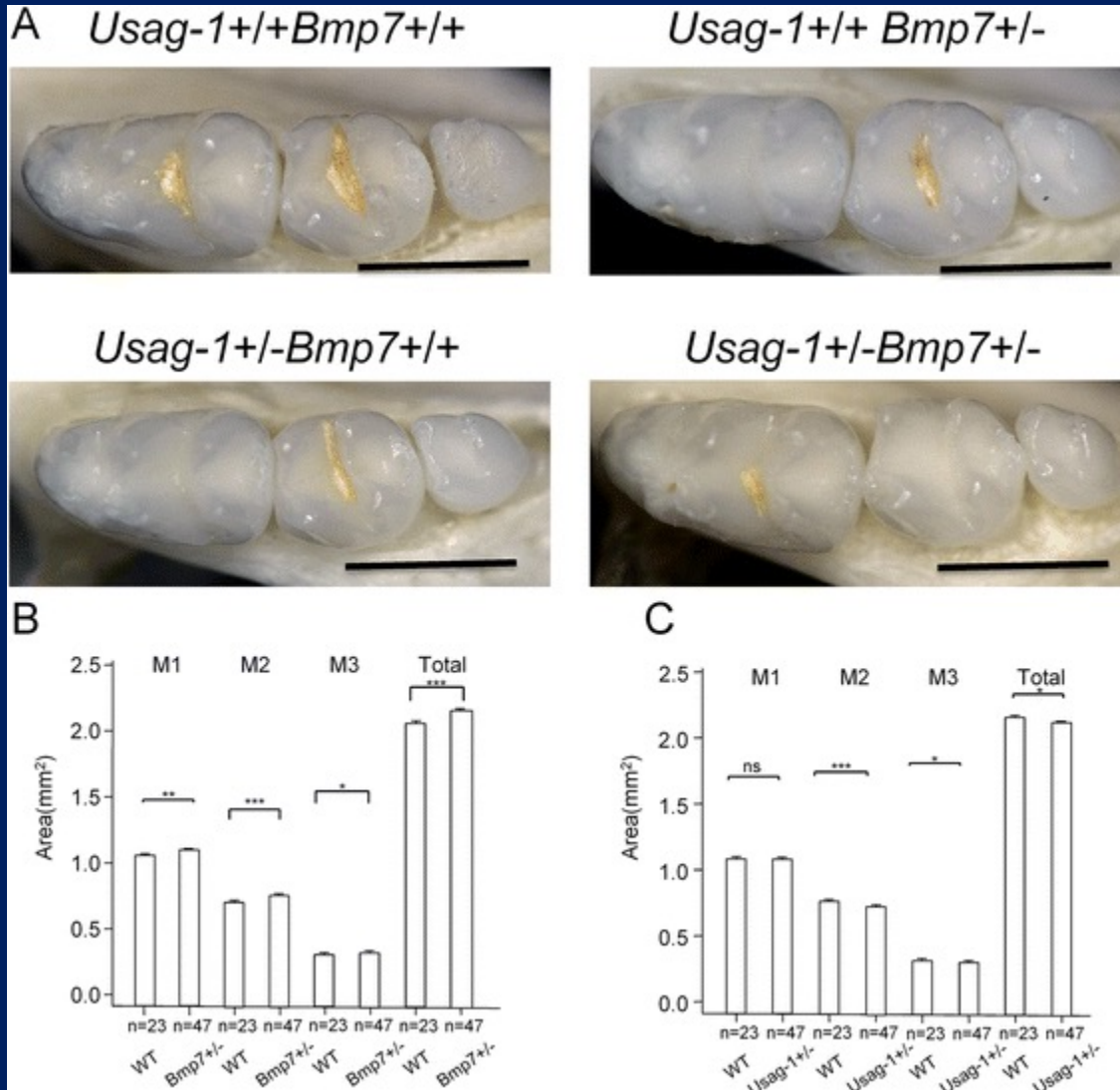
Usag-1^{-/-}
不正咬合



Usag-1^{-/-} *Bmp7*^{+/-}
不正咬合



出生後マウスの臼歯の表現型解析

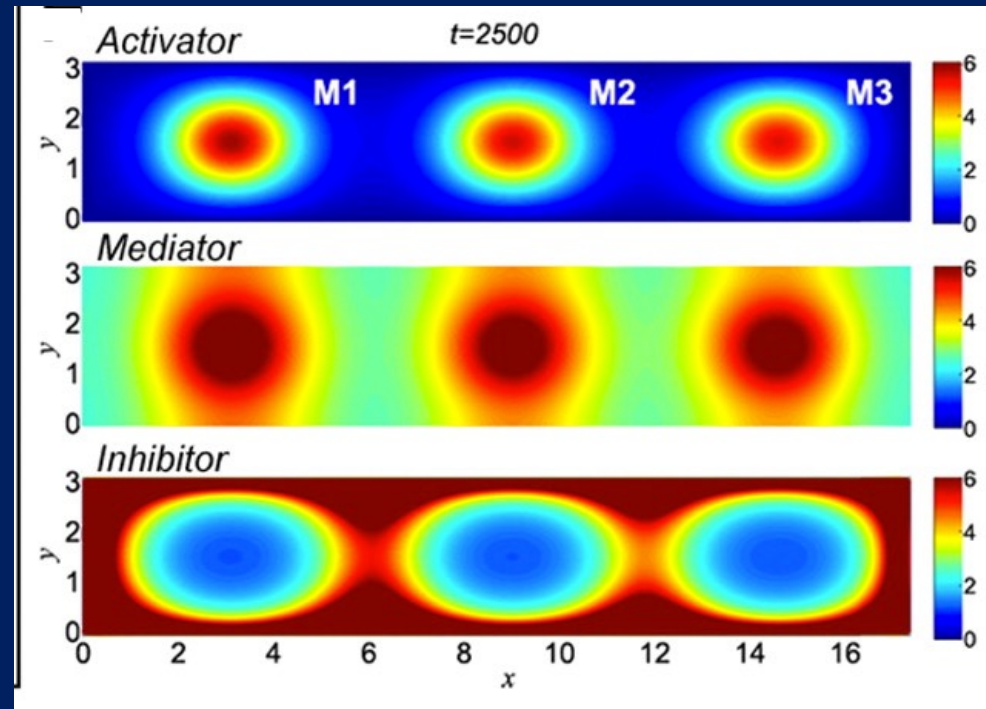
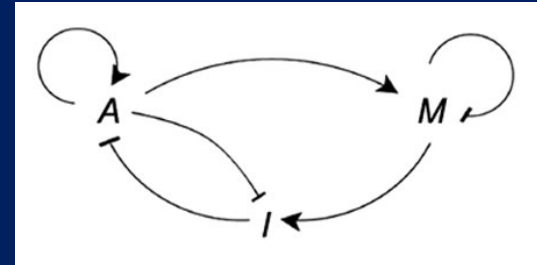
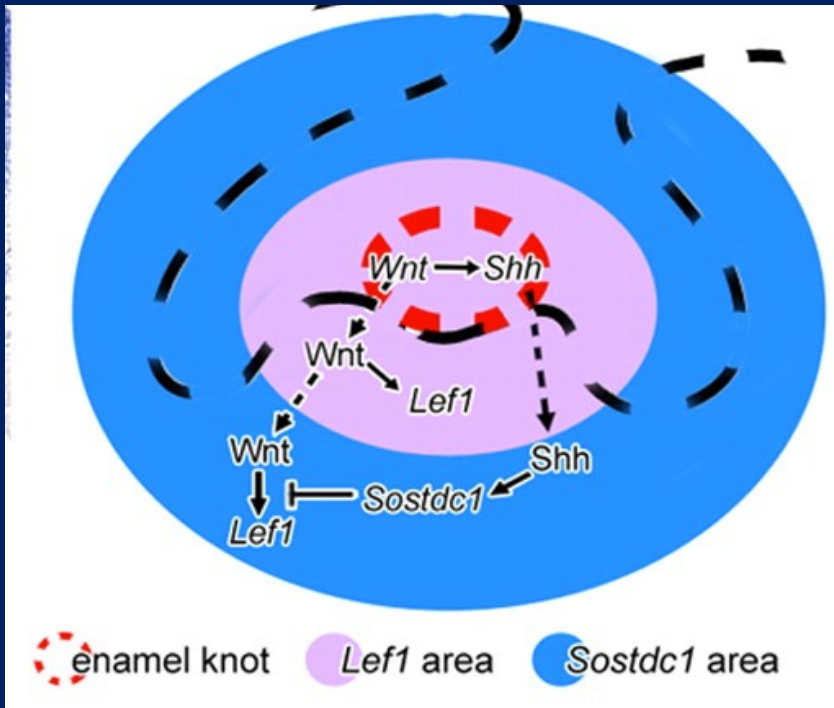


遺伝子型と下顎臼歯の大きさの変化 を解析した一般化線形モデル

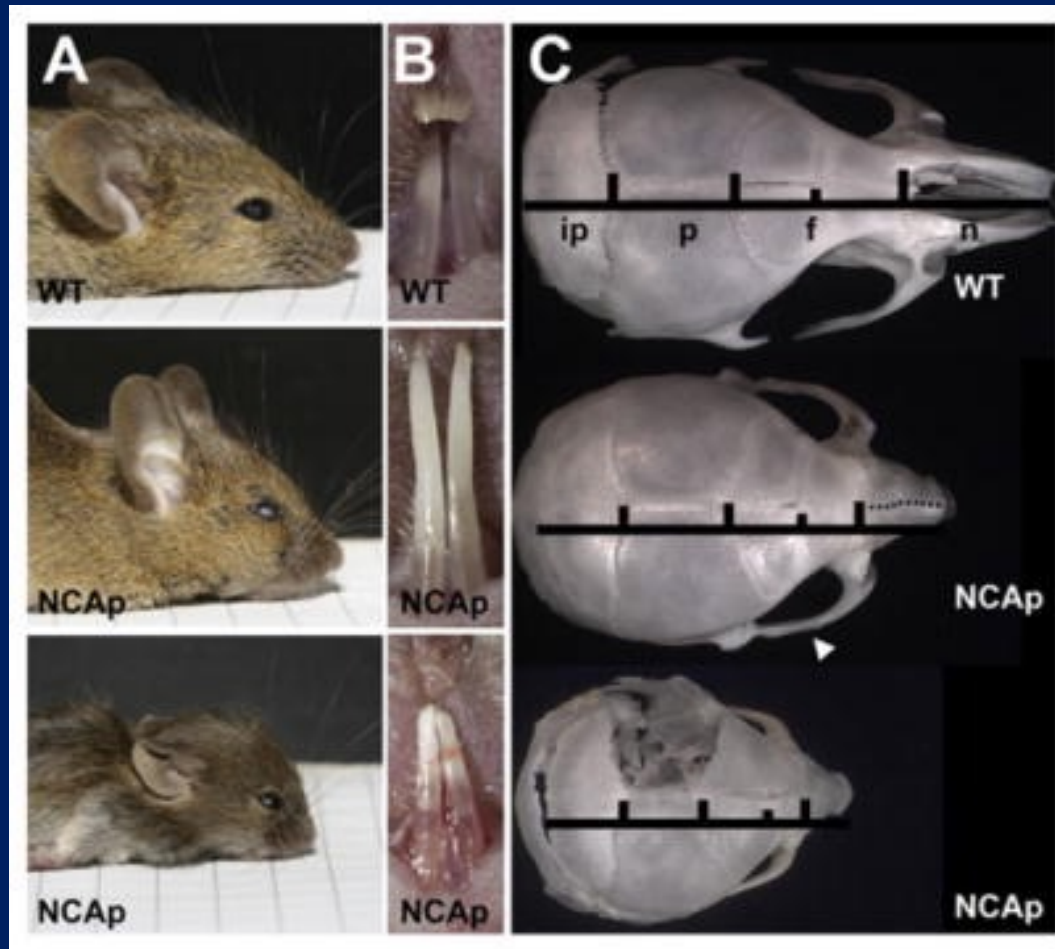
	Estimate	Std.Error	T value	P value
<i>Usag-1+/-</i>	-0.05311	0.02503	-2.122	0.03755
<i>Bmp7+/-</i>	0.09814	0.02503	3.921	0.00021

Usag-1とネガティブフィードバック ループと歯の形態形成

M1 E14



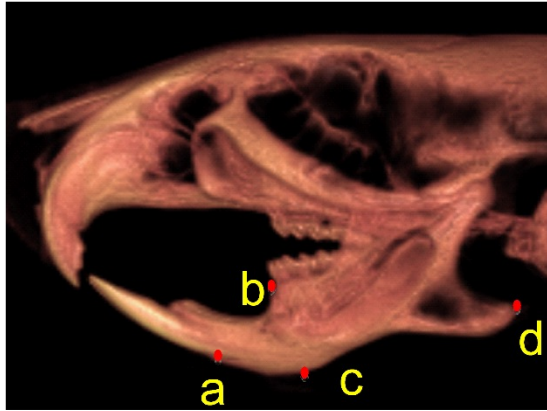
Apert症候群のモデルマウス Fgfr2 conditional null mouse 下顎骨の未発達と歯の低形成



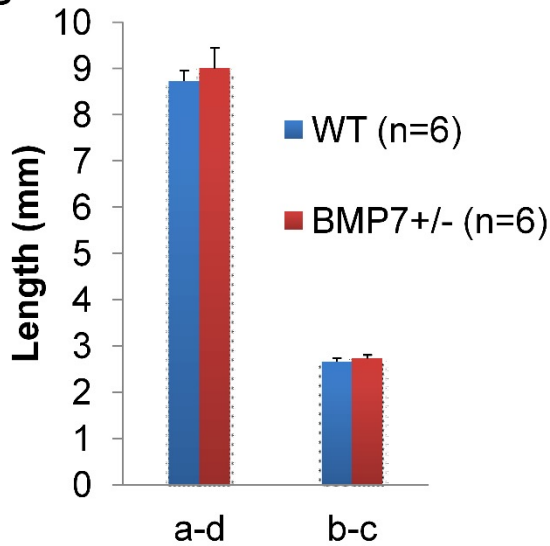
(Greg Holems, Dev Biol. 2012)

Bmp7 と *Usag-1* 改変マウスにおける 遺伝子型による下顎の形態の違い

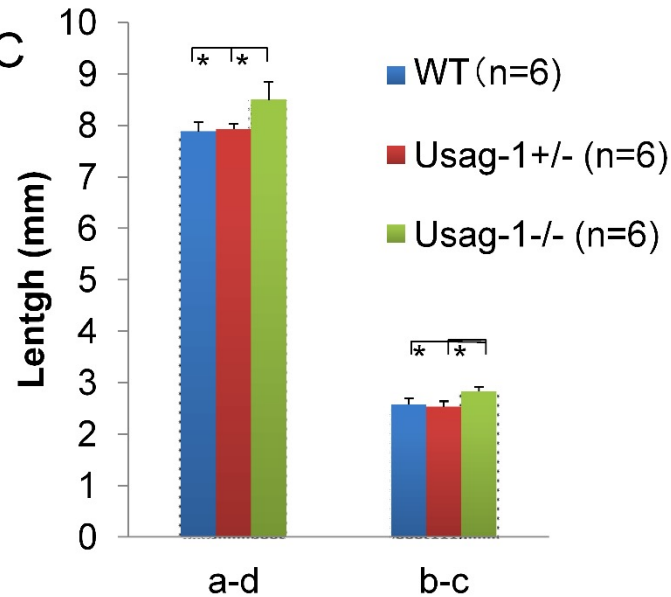
A



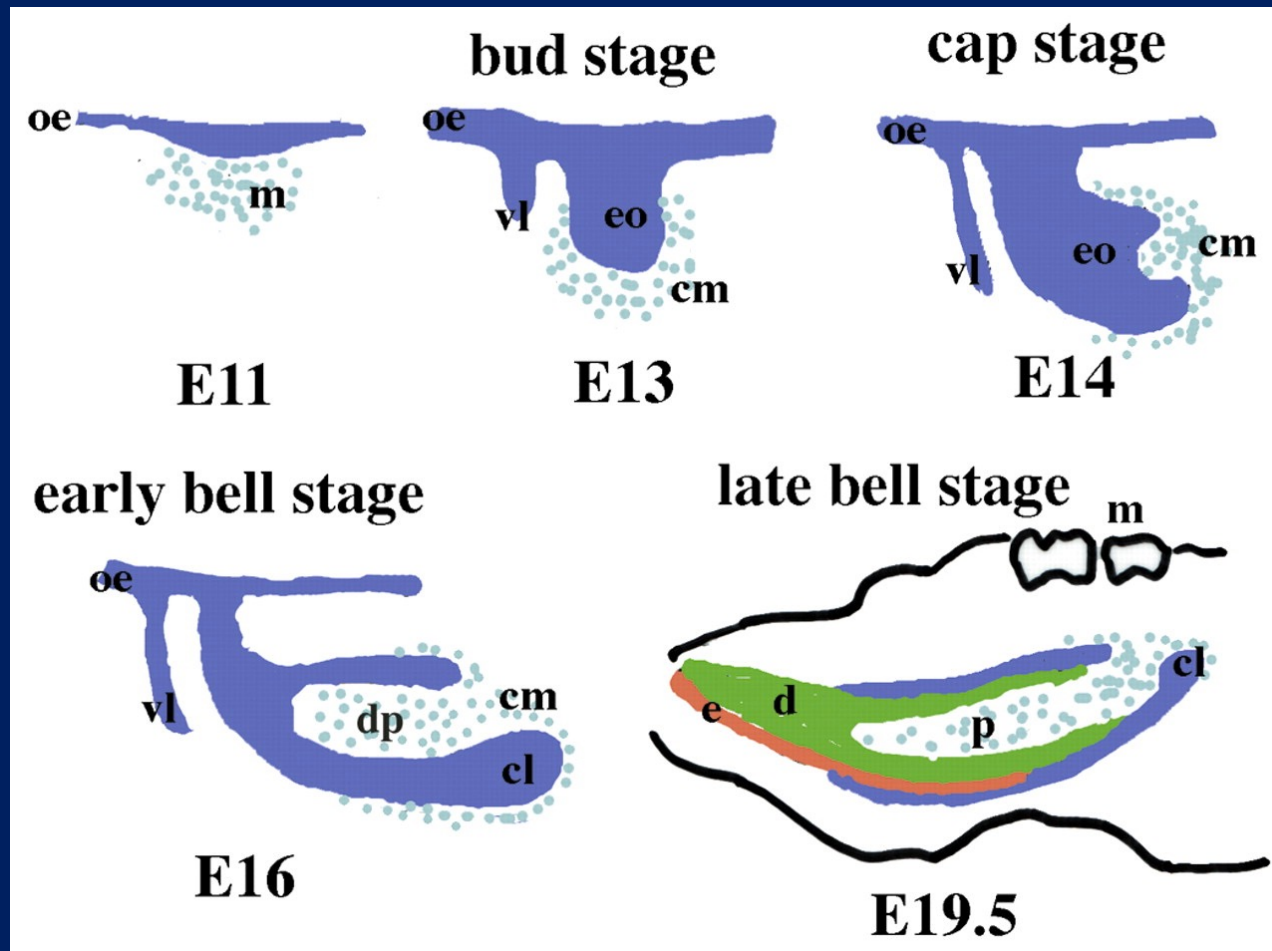
B



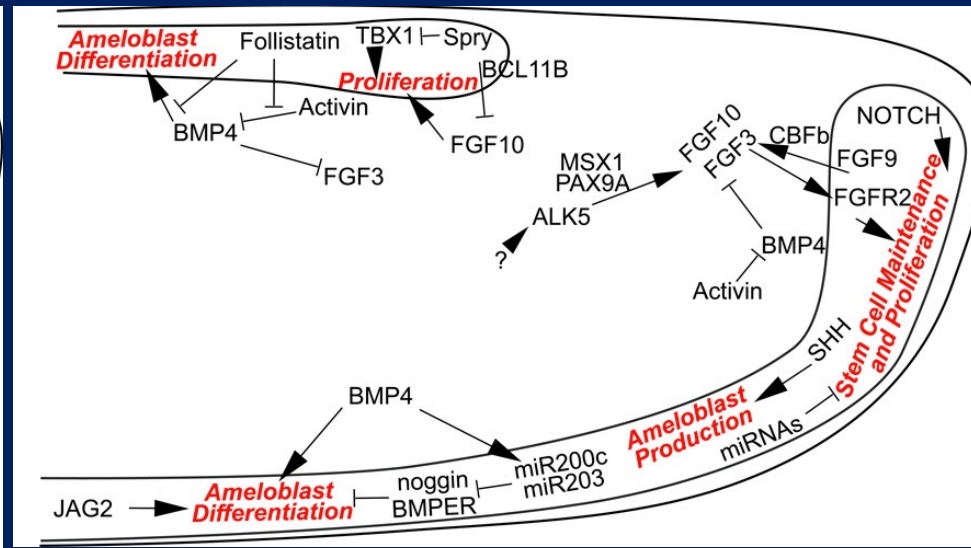
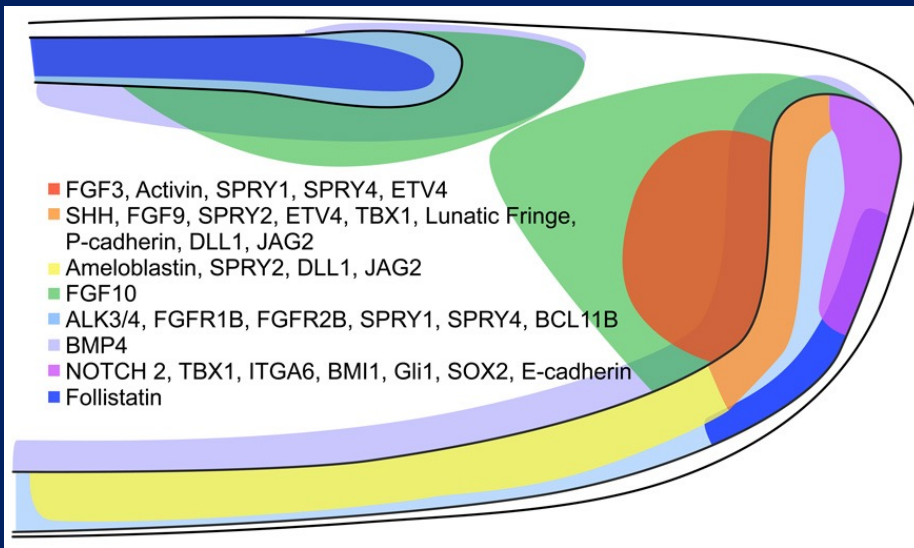
C



胎生期の歯の発生過程と大きさに 関わる時期の考察



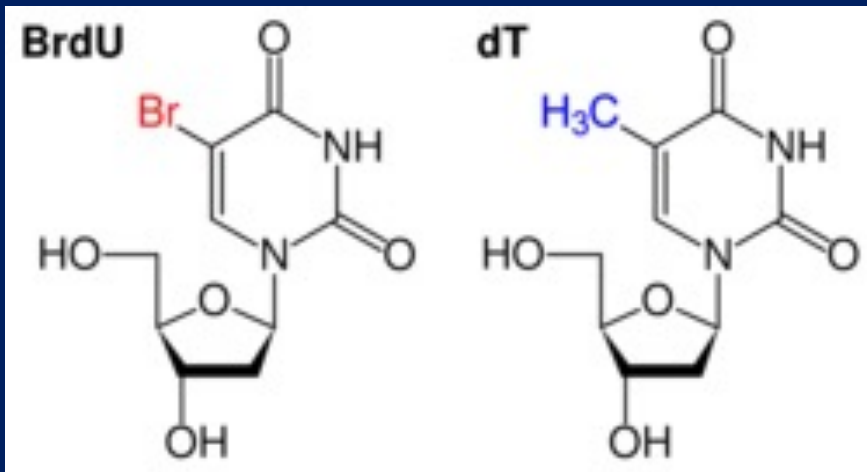
下顎切歯のエナメル上皮幹細胞に 発現が報告されている遺伝子



ブロモデオキシウリジン

BrdU免疫染色の原理

チミジンアナログである
ブロモデオキシウリジン

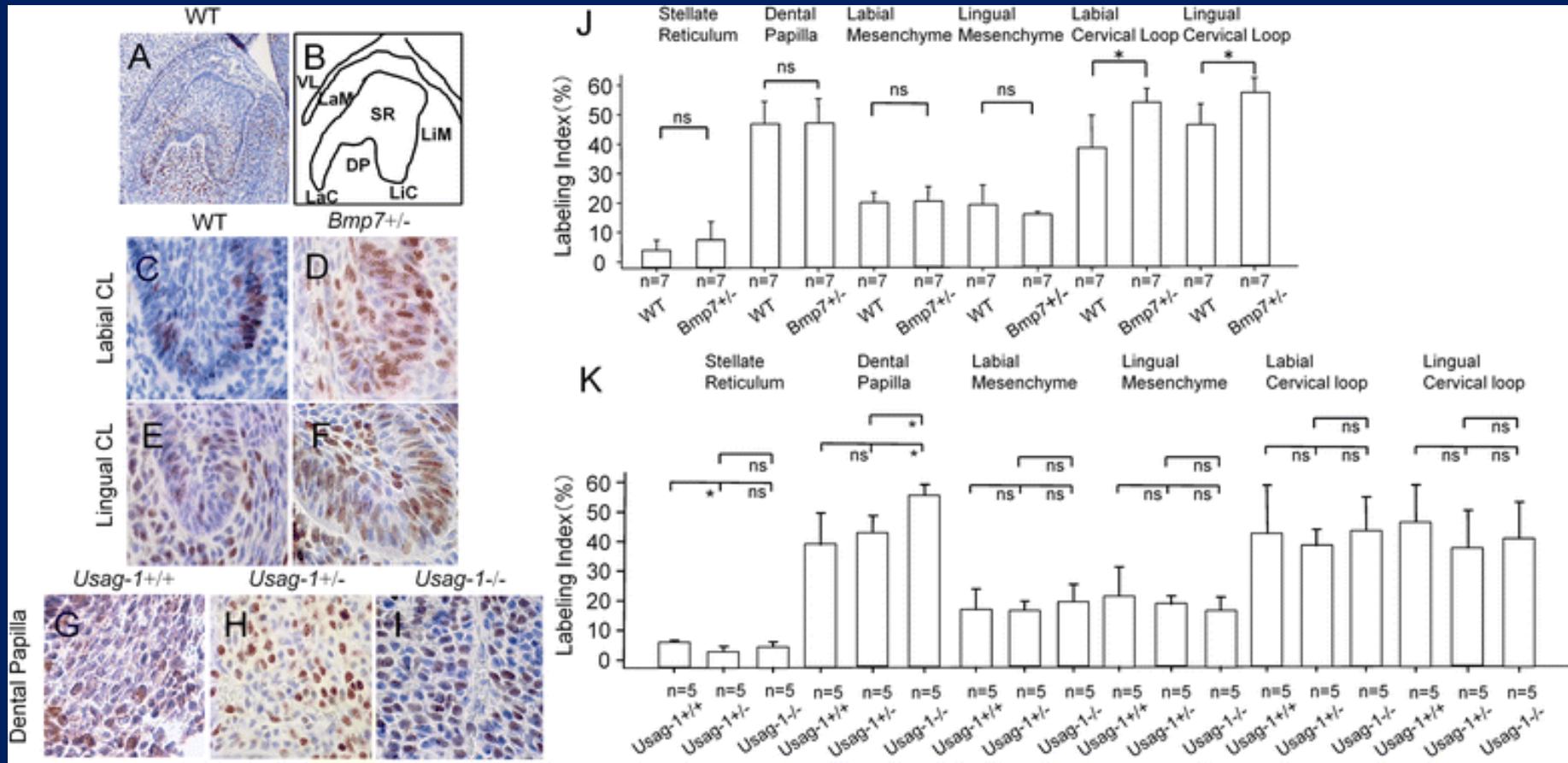


streptavidin法

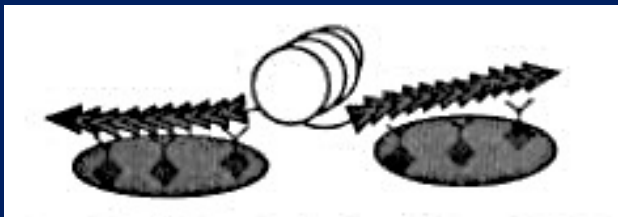
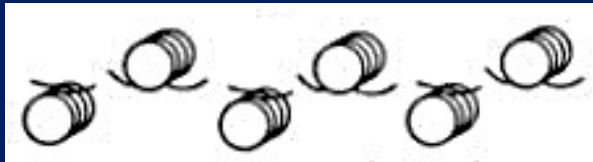


BD pharmingen™ BrdU In-situ Detection Kit
(Cat. No.550803、551321)

胎生15日目の下顎切歯におけるBrdU免疫染色



TUNEL免疫染色の原理

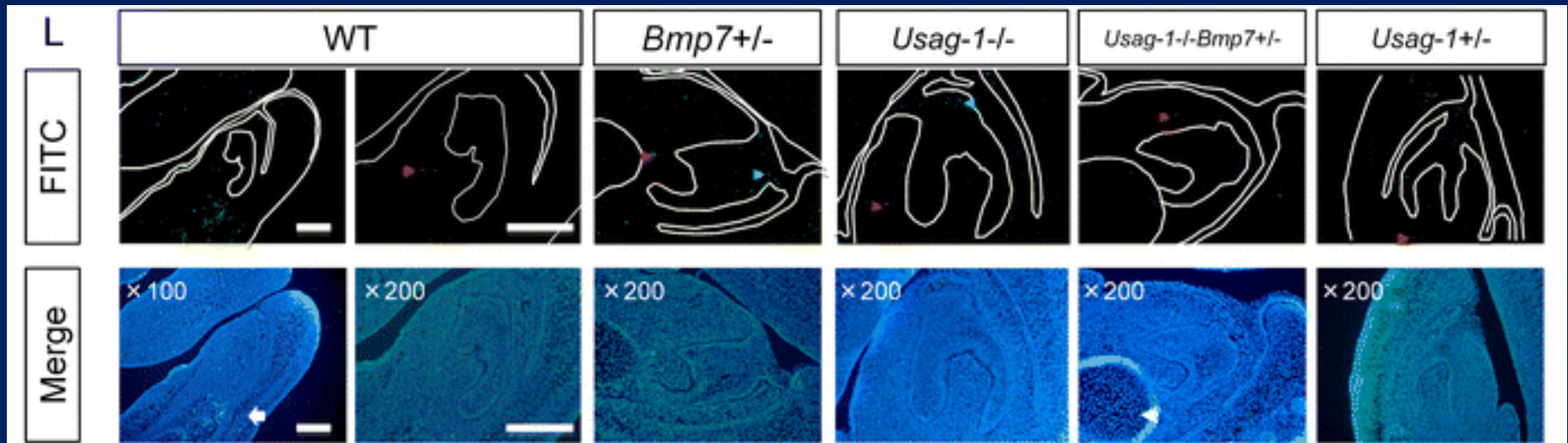


アポトーシスによりヌクレオソーム単位に断片化されたDNA3'末端に**末端核酸付加酵素ターミナルトランスフェラーゼTdT**によって、ジゴキシゲニンdNTPを付加する。それにペルオキシダーゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体を結合させる。さらに、フルオレセインをペルオキシダーゼを介して結合させ、蛍光顕微鏡にて検出する。

ApopTag® Plus Fluorescein *In Situ*

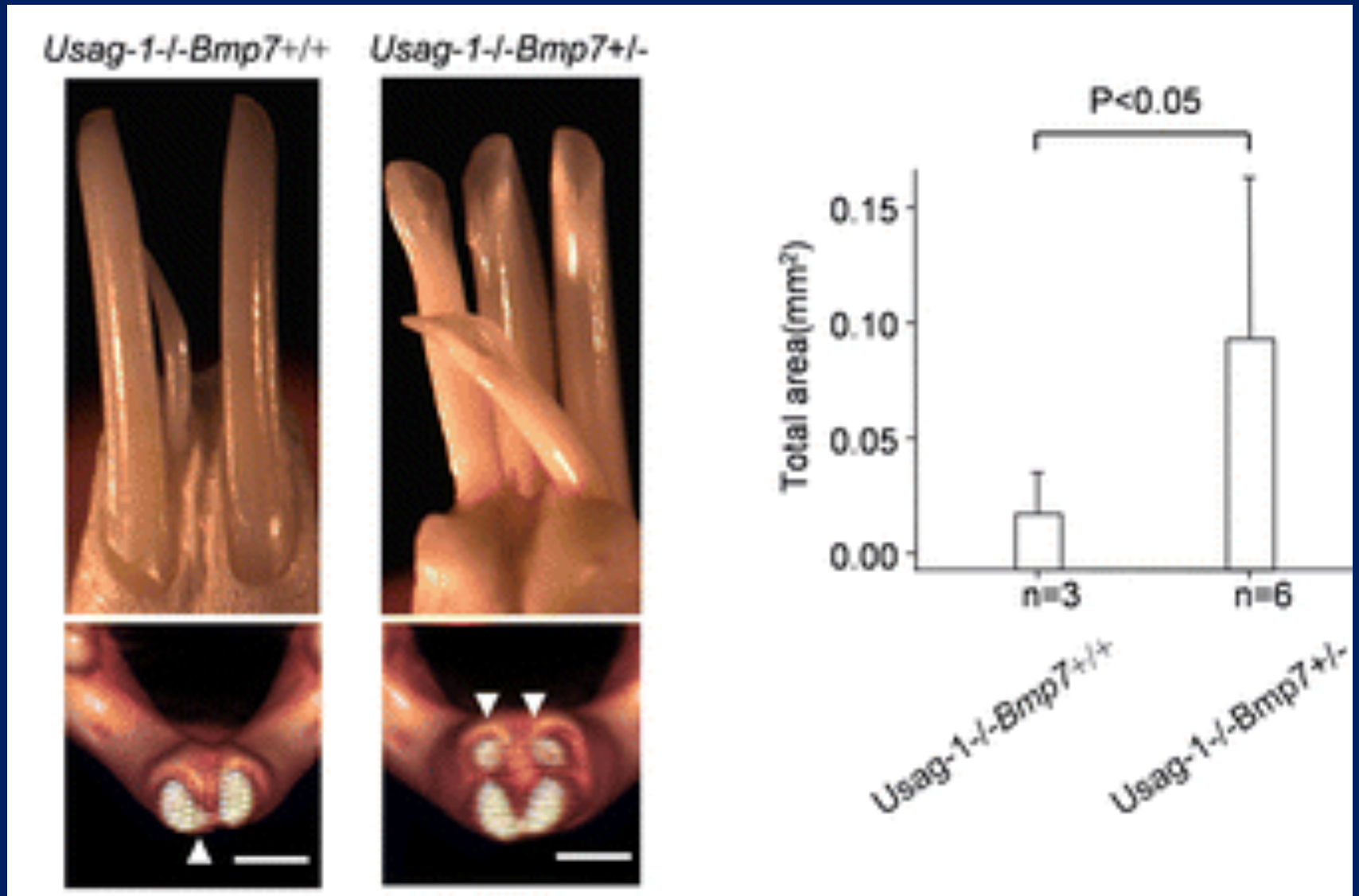
Apoptosis Detection Kit
S7111

胎生15日目における下顎切歯のTUNEL染色



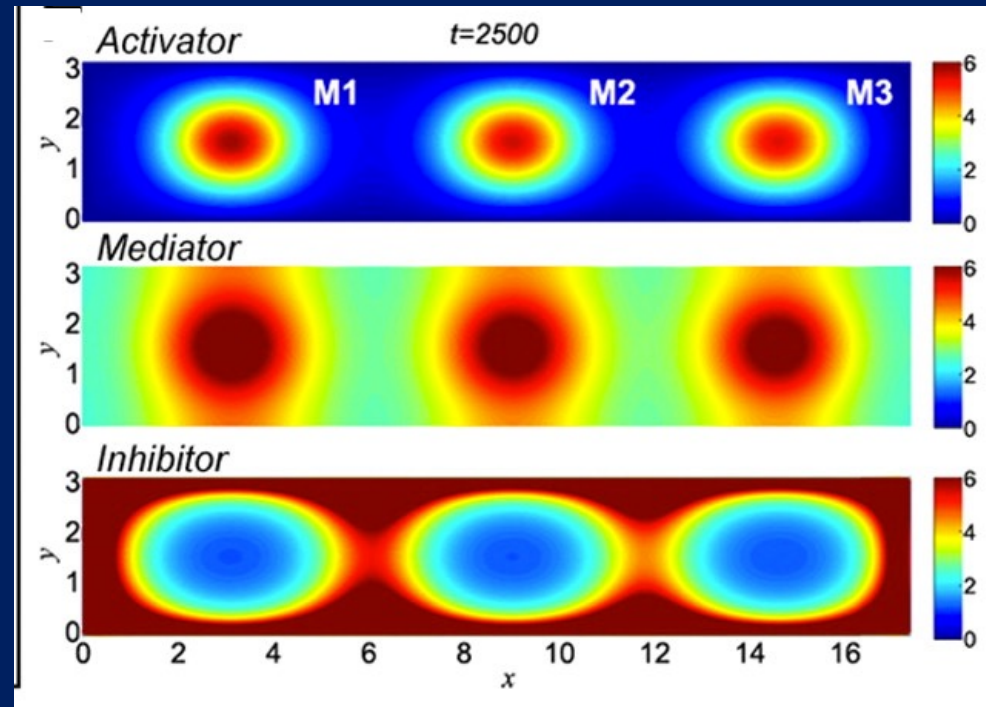
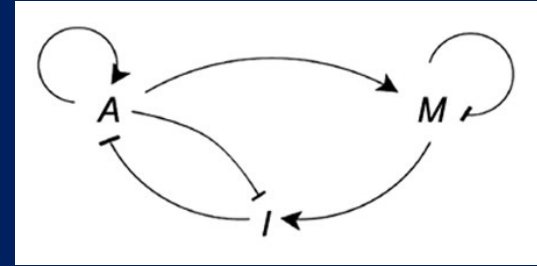
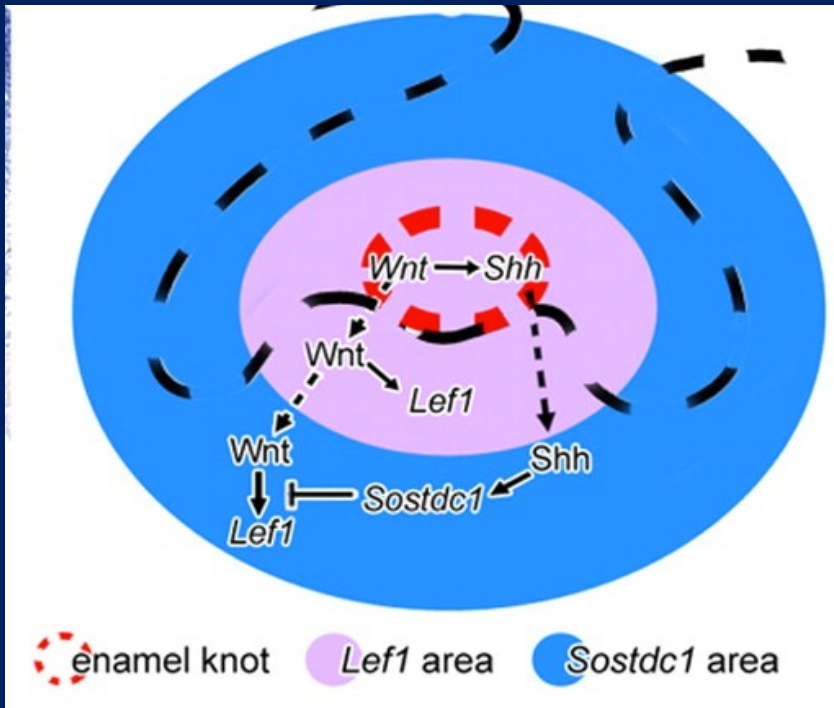
Saito et al. BMC Developmental Biology
(2016)

出生後マウスの過剰切歯の表現型解析



Usag-1とネガティブフィードバック ループと歯の形態形成

M1 E14



(Sung-Won Cho et. al Development, 2011)

考察1

*Bmp7*Hetでは下顎切歯大臼歯の体積断面積が有意に増大していた。*Bmp7*KOでは下顎切歯の形成が見られないあるいは低形成であるため、Hetとは逆の表現型であった。

*Usag-1*Hetでは下顎切歯大臼歯の体積断面積が有意に減少していた。*Usag-1*KOでは下顎切歯大臼歯の体積断面積が有意に増大していたが、下顎骨の大きさの変化の影響も考えられた。HetとKOは逆の表現型であった。

HetとKOの表現型が逆であることの解明には、下流の遺伝子の発現をマイクロアレイや次世代シーケンサーを用いて解析することを想定している。この現象はハプロ不全という用語にあたると思われるが、典型的な報告例は認められない。

考察2

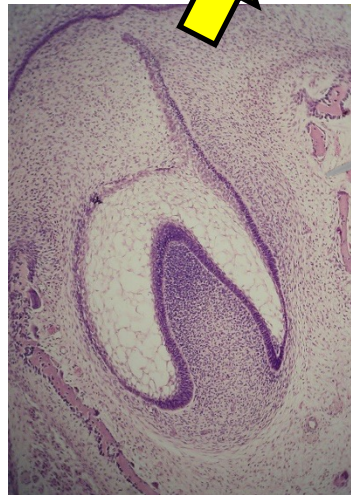
ダブルノックアウトマウスでは、下顎切歯の体積と断面積の増加において、*Bmp7*と*Usag-1*の発現量減少による作用は相加的であった。それらの遺伝子の歯の大きさの作用機序が異なることを示している。胎生15日目において、*Bmp7*Hetではcervical loopの増殖率がWTより大きく、*Usag-1*KOでは歯乳頭の増殖率がWTやHetより大きかった。

臨床応用として、歯の再生において、局所的に遺伝子操作を行うことで、歯の大きさも制御できる可能性がある。一般化線形モデルにおいて、BMP7はヘテロで歯の体積断面積の増大と強く相関していることから、その有力な候補となると思われる。

歯の大きさの制御



遺伝子操作



第三生歯

外植体

外エナメル

上皮



中和抗体
核酸製剤
siRNA
CRISPR/Cas9

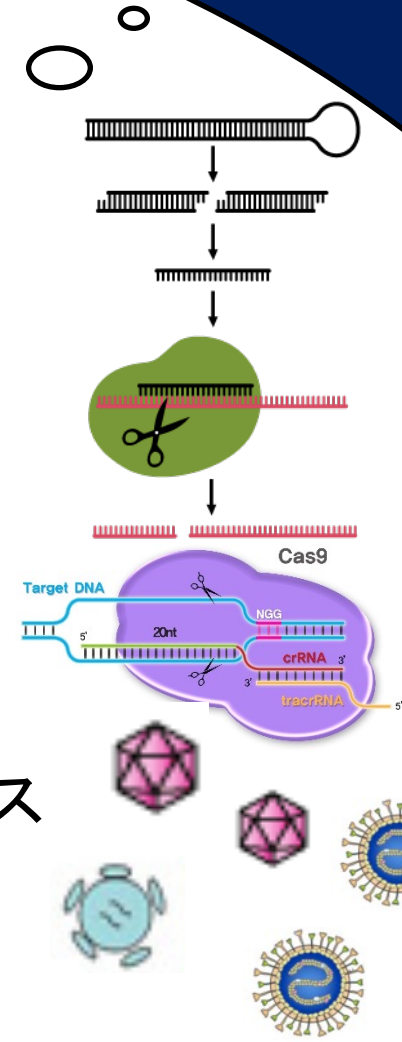
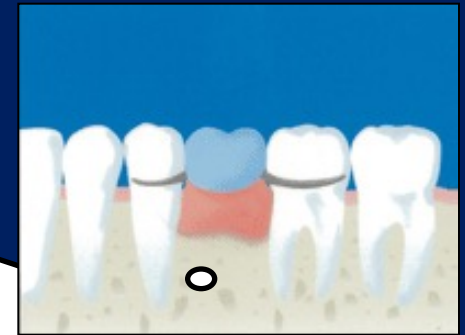
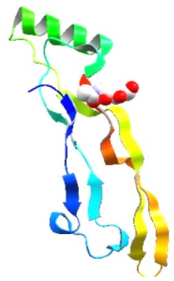
(ベクター)

アデノ随伴ウイルス
センダイウイルス
レンチウイルス
(キャリア)

発現量
低下
調整

BMP7

USAG1



京大博物館との共同研究

BMP7の分子進化と食肉目の進化

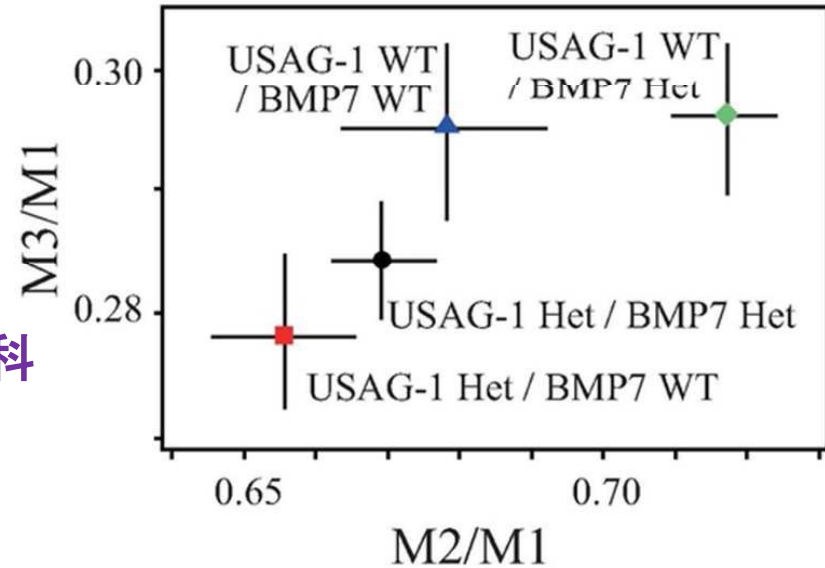
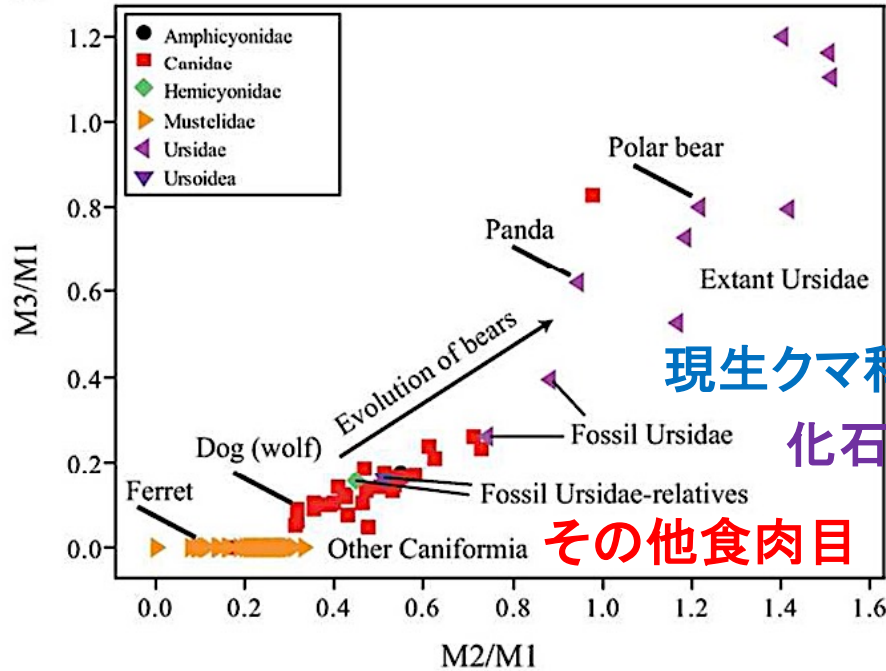
三重大学教養教育機構

浅原 正和

歯科口腔外科

斎藤 和幸

BMP7の分子進化とクマ科の歯の進化①



$M1 > M2 > M3$

$M1 < M2 > M3$

M_1 / M_2 の比率のみが変化する

(Asahara M, Proceedings B, 2011)

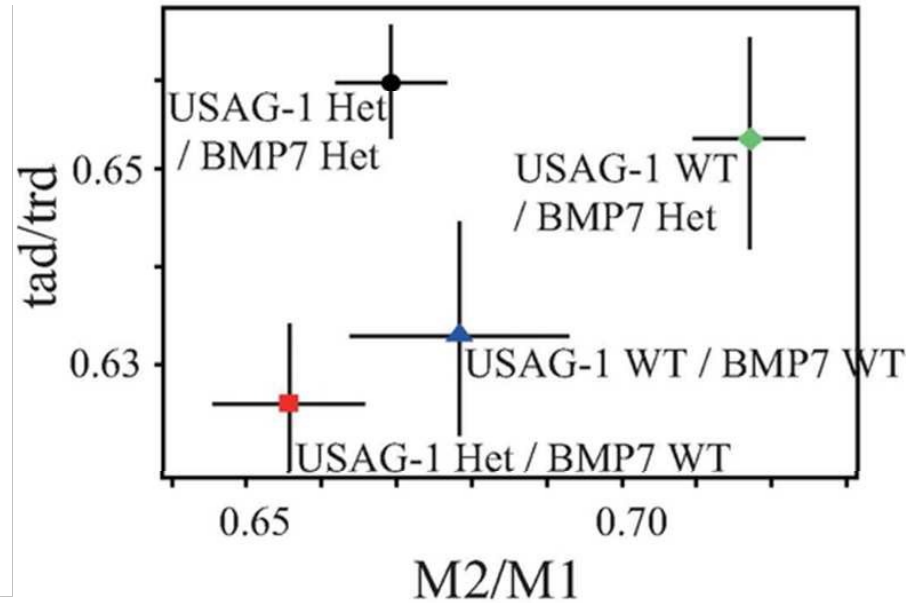
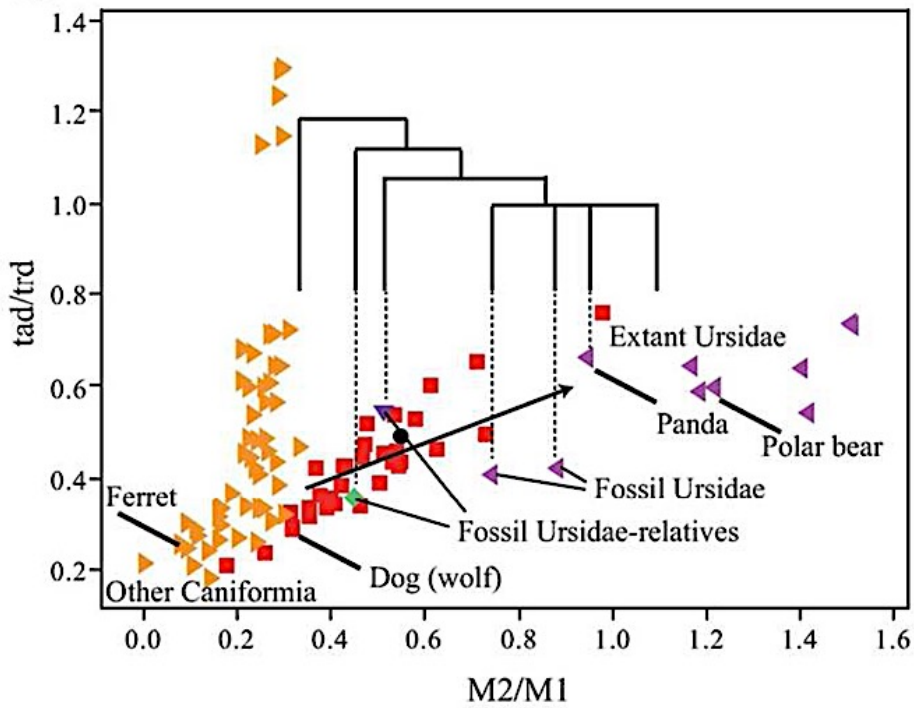
食肉目祖先型

クマ科

クマ科の系統で徐々に特殊化

(一般的な食肉目 → 化石クマ科 (Miocene ~) → 現生クマ科の順)

BMP7の分子進化とクマ科の歯の進化②



(Asahara M, Proceedings B, 2016)



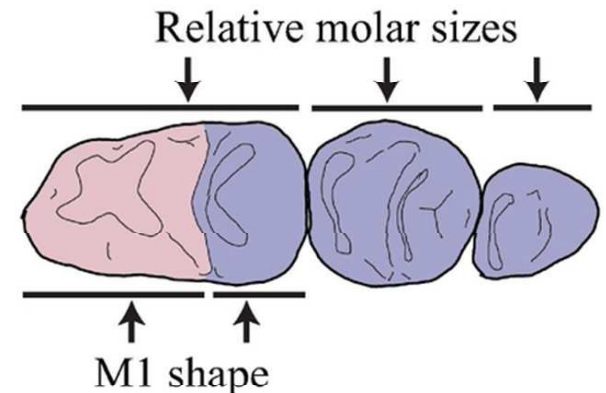
$M1 > M2 > M3$

食肉目祖先型



$M1 < M2 > M3$

クマ科

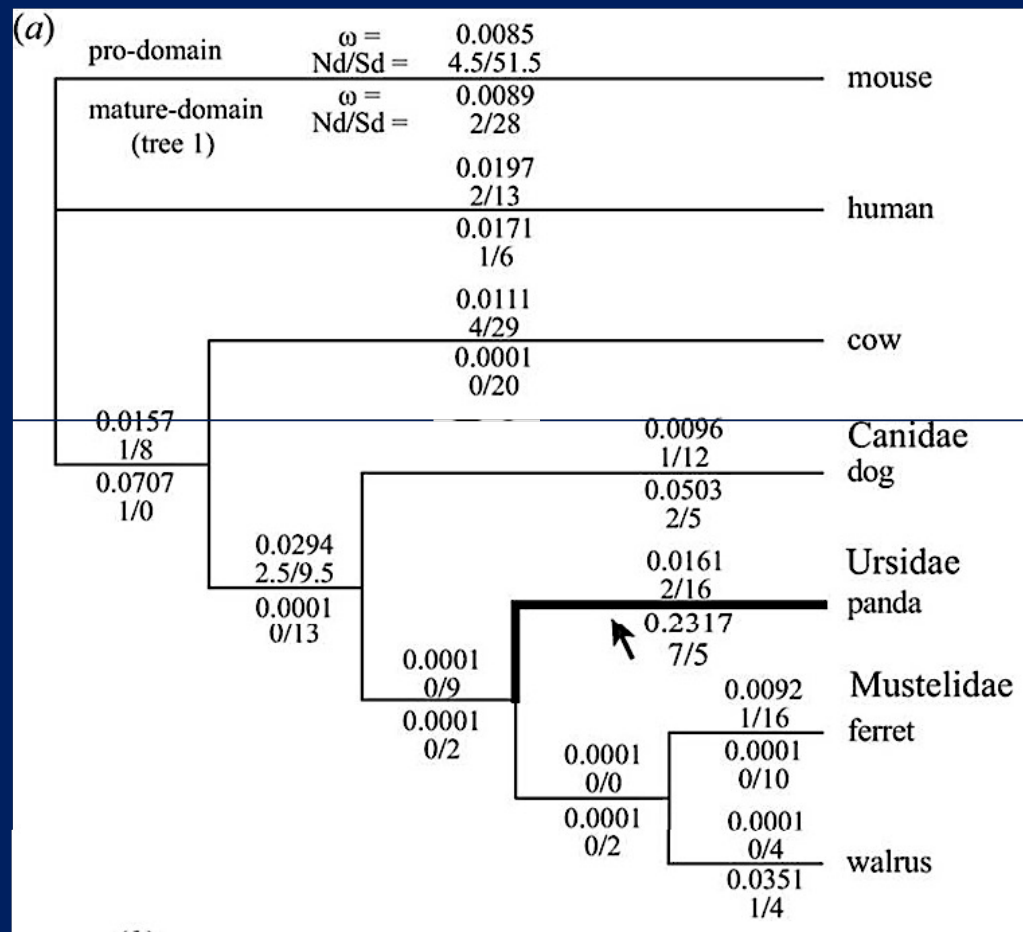
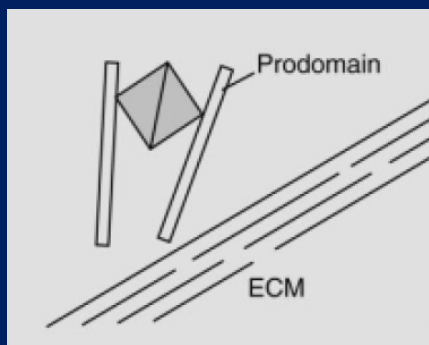


BMP7の分子進化と クマ科の歯の進化③

BMP7 pro-domain

非同義置換／同義置換比

ω 種間比較



パンダ(クマ科)の系統で高い非同義置換
／同義置換比

(Fisher's exact test; $p < 0.05$)

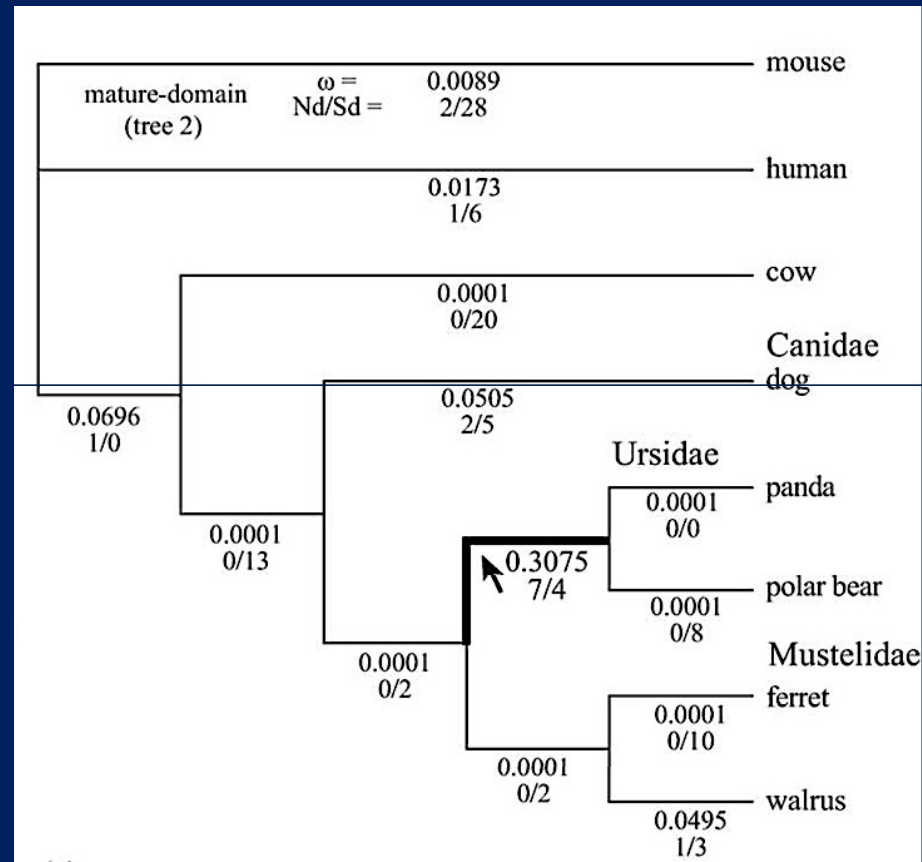
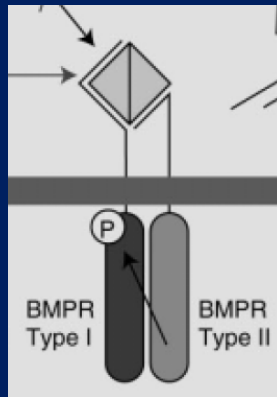
→ BMP7に選択圧がかかって適応進化が
起きた

(Asahara M, Proceedings B, 2016)

BMP7の分子進化とクマ科の歯の進化④

BMP7 mature-domain

非同義置換／同義置換比 ω 種間比較



(Asahara M, Proceedings B, 2016)

(Fisher's exact test; $p < 0.05$)

考察

*Bmp7*Hetマウスは、下顎臼歯の相対サイズが変化し、M2が大きくなり、M1の形態はタロニッドが大きくなっていた。食肉目臼歯の多様性とInhibitory cascade modelを比較すると、クマ科は食肉目の祖先型から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。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。

共同研究者

京都大学総合博物館

本川雅治

三重大学 教養教育機構

浅原正和

京都大学大学院医学研究科内科学講座

腎臓内科学分野

柳田素子

京都大学医学部探索医療開発学

清水章

福井大学分子遺伝学分野

菅井学