ラット歯胚の発生過程におけるセロトニンの局在 およびセロトニン受容体の mRNA の発現

米 田 清 之 亮

九州歯科大学歯科保存学第1講座 (指導: 寺下正道教授)

九州歯科大学口腔解剖学第2講座 (指導: 豊島邦昭教授)

平成 11 年 12 月 27 日受理

Uptake Sites of 5-HT and Expression Pattern of 5-HT Receptor Subtype mRNAs during Morphogenesis of Tooth Germ in the Rat

Seinosuke Yoneda

Department of Operative Dentistry (Director: Prof. Masamichi Terashita)

Second Department of Oral Anatomy (Director: Prof. Kuniaki Toyoshima)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Serotonin (5-HT) is one of the well known monoamine neurotransmitters, mitogen, and hormones, which mediate a wide variety of physiological effect, including peripheral and central actions. The large variety of 5-HT functions is paralleled by the pharmacological complexity of 5-HT receptors which can be classified into different families depending on their signalling pathways. A study by 5-HT_{2B} antagonists showed 5-HT and 5-HT_{2B} receptor function in development of tooth germ. To elucidate the role of them, I have examined the localization of 5-HT immunohistochemically and the expression of 5-HT_{2B} subtype receptor by *in situ* hybridization in rat tooth germ. At the bud stage both 5-HT and 5-HT_{2B} mRNA were not detected in incisors and molars. At the cap stage both 5-HT and 5-HT_{2B} mRNA were detected in the enamel organ and dental papilla. 5-HT were intensely localized at the inner enamel epithelium. Otherwise 5-HT_{2B} mRNA were intensely expressed in the mesenchymal cells of the dental papilla. At 1 day postnatal presence of 5-HT and 5-HT_{2B} mRNA were also shown in the tooth germ of incisor and molar. However their intensity were decreased gradually in the process of differentiation of ameloblasts and odontoblasts. These results indicate that 5-HT and 5-HT_{2B} play a role in tooth development.

Key words: Serotonin / Serotonin receptors / Tooth / Development

緒 言

セロトニン (5-HT) は神経伝達物質として良く知られたモノアミンであるが、末梢においても、中枢においても広い生理作用を持つ。5-HT はセロトニン受容体

(5-HT 受容体) を介してその生理活性を発現するが、ヒトの 5-HT 受容体は 14 種に及び、cDNA クローニングにより 7 つのファミリーに分類される^{1,2)}。それらは G 蛋白結合膜 7 回貫通型ファミリーに属するタイプと、イオンチャンネル内蔵型に分けられる。7 回膜貫通型のう

ち 5-HT₁ 受容体ファミリーおよび 5-HT₅ 受容体は、アデニル酸シクラーゼを抑制し cAMP の合成抑制を通じて Ca²⁺ チャネル抑制、K⁺ チャネル開口促進により神経伝達物質放出抑制を引き起こすと考えられている³⁾。5-HT₂ 受容体ファミリーは、ホスホリパーゼ C を活性化する G 蛋白に共役し、細胞内 Ca²⁺ 動員と Ca²⁺ 依存性 K⁺ および Cl⁻ チャネル活性化、C キナーゼ活性化、蛋白質リン酸化を通じて生理機能を引き起こす³⁾。5-HT_{4,6,7} 受容体は、アデニル酸シクラーゼを活性化し cAMP の合成促進を通じて、生理機能を引き起こすと考えられている³⁾。イオンチャンネル型は 5-HT₃ 受容体のみであり、脱分極を引き起こす⁴⁾。

最近、この 5-HT および 5-HT 受容体が頭蓋顎顔面の発生に関わっていることが報告されている⁵⁻⁹⁾。Shuey ら (1992)⁸⁾、(1993)⁹⁾ は、マウスの胎児を 5-HT を添加した培地で培養すると発生中の上顎、下顎、耳胞および鼻突起に 5-HT が取り込まれることを報告した。また、この培地に 5-HT 取り込み阻害剤であるフルオキセチンを添加して培養すると 5-HT の取り込みが阻害され頭蓋顎顔面の発生に異常をきたし、それは上顎および下顎の発育不全、また水晶体胞の陥入不全に及ぶことを示した。5-HT_{2B} 受容体に対するアンタゴニストを培地に添加した実験でも、同様な発育異常が報告されている¹⁰⁾。Choi ら (1997)¹⁰⁾ は、胎生 8-9 日のマウスを 5-HT_{2B} 受容体のアンタゴニストであるリタンセリンを加えた培地中で培養すると顎部、心臓および神経管に形成異常が生じたことを報告した。これにより 5-HT および 5-HT_{2B} 受容体が形態形成に関わっていることが示された。

歯の発生にも 5-HT および 5-HT 受容体が形態形成に関わることが考えられる。Lauder ら (1988)⁶⁾ は胎生 14 日のマウス胚を、5-HT を添加した培地に 3 時間器官培養した後に、抗 5-HT 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、歯胚の間葉細胞に 5-HT の取り込みを認めたことを報告した。同様に 5-HT を添加した培地に、胎生 13 日のマウスの下顎を 2 日間器官培養した後、抗 5-HT 抗体を用いて免疫染色すると、歯胚の上皮細胞および口腔上皮細胞に 5-HT が取り込まれた報告もある¹¹⁾。さらに、培地にフルオキセチンを加えるとこの免疫反応が完全に阻害された¹¹⁾。この器官培養系で培地に 5-HT の濃度を変えて添加し 8 日間培養すると、培地中に 5-HT を 0.01 μ M 添加した実験群では歯胚は帽状期までしか分化せず、100 μ M 添加した群では鐘状期まで分化が進んだ。この培地にフルオキセチンを添加すると、歯胚の発生は完全に阻害された¹¹⁾。

このように 5-HT および 5-HT 受容体は歯の発生に関与していると考えられているが、歯の発生の初期から *in vivo* における 5-HT の局在および 5-HT 受容体の発現を検索した報告はない。以上のことから本研究では第一に、ラットでクローニングされている 5-HT 受容体 12 サブタイプの mRNA の *in vivo* における発現を RT-PCR 法を用いて検索した。続いて *in vivo* におけるラットの発生期歯胚の 5-HT の局在をモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に、さらに形態形成に特に関係すると考えられている 5-HT_{2B} 受容体の mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検討した。

材料および方法

I. 材料

胎生 15, 17 日および生後 1 日の SD 系ラットを用いた。麻酔下 (ペントバルビタール, 40 mg/kg) にて妊娠 15, 17 日目のラットを開腹し、胎仔を摘出した。胎仔および新生仔を麻酔下 (ペントバルビタール, 40 mg/kg) にて断頭後下顎を取り出し、4 % パラホルムアルデヒドで 4 °C、一晚浸漬固定した。

II. 免疫組織学的染色法

試料をエタノール系列で脱水しパラフィン包埋した後、約 7 μ m の切片を作製した。切片を脱パラフィン後、3 % H₂O₂ を含む PBS に 30 分間浸漬し内在性ペルオキシダーゼを阻止した。その後 10 % 正常ウマ血清を 20 分間反応させ免疫染色に供した。

一次抗体にはモノクローナル抗マウス 5-HT 抗体 (DAKO, USA) を用い、4 °C で一晚反応させた。免疫染色は Vectastain Elite ABC mouse IgG kit (Vector Laboratories, USA) を用いた ABC-ペルオキシダーゼ法により行った。免疫反応後の切片は HRP-DAB 反応により発色させた。その後切片をメチルグリーンで対比染色し、通法に従い脱水、封入して顕微鏡観察を行った。

III. RT-PCR

生後 1 日の SD 系ラットの下顎切歯より抽出、精製した 1 μ g の total RNA を鋳型とし、oligo dT、逆転写酵素 (RAV-2, 宝酒造) を用いて 42 °C で 1 時間逆転写反応を行った。合成された一本鎖 cDNA を PCR 反応の鋳型として、ラットでクローニングされている 12 種類の 5-HT 受容体のプライマーを用いて (Table 1)¹²⁻²²⁾、94 °C 30 秒、60 °C 30 秒、72 °C 1 分間のサイクルを 35 回行い、最後に 72 °C 10 分間反応させた。生後 1 日のラットの下顎切歯に発現する 5-HT 受容体のサブタイプを確

Table 1 Oligonucleotide primers used in polymerase chain reaction for amplification of 5-hydroxytryptamine receptor subtypes

Receptor subtype	Primer	Position (bp)	Expected length (bp)
5-HT1A	5'-AGCATCTCCGACGTGACCTTCAGCTACCA-3'	79-107	635
	5'-GCTCCCTTCTTTTCCACCTTCCTGACAGT-3'	713-685	
5-HT1B	5'-GCCGACGACTACATTTACCAGGACTCCAT-3'	91-119	643
	5'-TGCCGGTCTTGTTGGGTGTCTGTTTCA-3'	733-707	
5-HT1D	5'-GCTTGGGACCCAGAGGTCCTGCAGGCACT-3'	73-101	630
	5'-CTTCCCGTAGAGGGAGGGTGGGTTTCAGGAT-3'	702-673	
5-HT1F	5'-TCAGAGGAAGTGTAAACCGAATGCCATC-3'	37-65	618
	5'-ACTTGCTTGTCTCTTGTGGTATAGTGTCC-3'	654-626	
5-HT2A	5'-CATGCCTCTCCATTCTTCATCTCCAGGAA-3'	124-152	611
	5'-CAAGGTGGCTTCTTTCTGAAGTGACTTGA-3'	734-706	
5-HT2B	5'-GCAGAATCAGCAGCAGAGGAAATGAAGCA-3'	203-231	341
	5'-ATGGCACAGAGATGCATGATGGAGGCAGT-3'	543-515	
5-HT2C	5'-GATGGTGGACGCTTGTTTCAATTCCCGGA-3'	124-152	612
	5'-TTGACGGCGCAGGACGTAGATCGTTAAGA-3'	735-707	
5-HT3	5'-GAGACCATCTTCATTGTGCAGCTGGTGCA-3'	904-932	415
	5'-ACAGCAGCGTGTCAGCACATATCCCACC-3'	1318-1290	
5-HT5A	5'-GCACTAGTCAGTCTTTTCTCTCAGCTTTC-3'	89-117	637
	5'-ATGGGGGAGACGCTGTTGGTCTTCCTGGA-3'	725-697	
5-HT5B	5'-GGCCGCGAGCCGCCCTTCTCTGCCTTCAC-3'	127-155	620
	5'-CGCCGTCTGCGGCCGAATCGAACTTGG-3'	746-719	
5-HT6	5'-TACTGTAATAGCACCATGAACCCTATCAT-3'	928-956	374
	5'-ACTGAGTGGATGCGGCCGTATCTCAGGCT-3'	1301-1273	
5-HT7	5'-GGAGCCTTCACTGTGTGCTGGCTGCCGT-3'	1009-1036	253
	5'-CTTCATGCATGCCTGCAGCAGAGAGCTTC-3'	1261-1233	

認するために、PCR 反応液の一部 (5 μ l) を 2 % アガロースゲルにて電気泳動した。

IV. *In situ* hybridization 法

A. プロブの作製法

PCR 産物を pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) にサブクローニングした。ベクターを制限酵素 Nco I で切断し、SP6 RNA polymerase を用いて転写を行いアンチセンスプロブを得た。また制限酵素 Spe I で切断後、T7 RNA polymerase を用いて転写を行いセンスプロブを得た。プロブをジゴキシゲニンで標識するために、DIG RNA Labeling kit (SP6/T7) (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany) を用いた。なおインサートについてシーケンスを行い塩基配列を確認した。

B. ハイブリダイゼーション

Kettunen ら (1998)²³⁾ の方法を改変して行った。プローブをハイブリダイゼーション溶液 (50 % formamide, 1.3 xSSC, 5 mM EDTA, 0.5 % CHAPS, 0.1 % Tween20, 1 % blocking powder, 100 μ g/ml tRNA, 50 μ g/ml heparin) で最終濃度 1 μ g/ml に希釈し、20-70 μ l を切片に滴下した後 55 $^{\circ}$ C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

C. 洗浄

切片を I wash (50 % formamide, 1 xSSC, 0.1 % Tween-20, 65 $^{\circ}$ C, 30 分) で 2 回、MABT (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.1 % Tween-20, 室温, 30 分) で 2 回の洗浄を行った。

D. 免疫組織化学

切片をブロッキング液 (MABT 中に 20 % normal goat serum, 2 % BBR) で 1 時間反応させた後、500 倍

希釈した Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany) または 100 倍希釈した Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany) を滴下し MABT で湿潤させたインキュベーションボックス内にて室温で一晩静置した。

E. 発色

切片を MABT (室温, 20 分) で 5 回, TNMT (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 5 mM levamisole, 0.1 % Tween-20, 室温, 10 分) で 2 回洗浄した。洗浄終了後, 発色溶液 (TNMT 中に 0.168 mg/ml NBT, 0.087 mg/ml X-phosphate) または LIQUID DAB SUBSTRATE-CHROMOGEN SYSTEM (DAKO, USA) にて発色を行った。その後, 封入して顕微鏡観察を行った。

なお, 以上の実験は「九州歯科大学における実験動物に関する指針」に準じて行った。

結 果

I. 5-HT 受容体プライマーを用いた RT-PCR

生後 1 日のラットの下顎切歯から精製した RNA を鋳型とし, ラットでクローニングされている 5-HT 受容体の 12 サブタイプのプライマーを用いて RT-PCR を行った。12 種類の受容体のうち, 5HT-2B, 3, 6, 7 受容体のバンドが検出できた (Fig. 1)。なお, PCR 産物はシーケンスを行い目的の塩基配列であることを確認した。

II. 下顎切歯歯胚における 5-HT の局在および 5-HT 2B 受容体の mRNA の発現

RT-PCR により発現を確認した 4 サブタイプのうち, 形態形成に関与していると考えられる 5-HT2B 受容体について *in situ* hybridization を行った。

A. 蕾状期歯胚

蕾状期において, 歯胚および周囲の歯乳頭間葉細胞に, 5-HT の局在, 5-HT2B 受容体の mRNA の発現は認められなかった (Fig. 2 a, b)。

B. 帽状期歯胚

1. 5-HT 局在の免疫組織学的染色所見

内エナメル上皮細胞, 外エナメル上皮細胞, 星状網細胞および歯乳頭間葉細胞はいずれも 5-HT の局在を示したが, 特に内エナメル上皮細胞に強い陽性反応が認められた (Fig. 3 a)。

5-HT2B 受容体アンチセンス鎖を用いた *in situ* hybridization の所見

内エナメル上皮細胞, 外エナメル上皮細胞, 星状網細胞および歯乳頭間葉細胞のいずれにも 5-HT2B 受容体の mRNA のシグナルが認められた。特に歯乳頭間葉細胞は顕著な陽性反応を示した (Fig. 3 b)。

5-HT2B 受容体センス鎖を用いた反応では, 特異的なシグナルは観察されなかった (Fig. 3 c)。

C. 生後 1 日の切歯歯胚

1. 5-HT 局在の免疫組織学的染色所見

星状網細胞, 中間層細胞および歯乳頭間葉細胞に反応が認められた (Fig. 4 a)。歯乳頭間葉細胞の反応は帽状

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products of mRNA from mandibular incisors removed from postnatal 1-day-old rats.

Lane 1: 5-HT1A, Lane 2: 5-HT1B, Lane 3: 5-HT1D, Lane 4: 5-HT1F,
Lane 5: 5-HT2A, Lane 6: 5-HT2B, Lane 7: 5-HT2C, Lane 8: 5-HT3,
Lane 9: 5-HT5A, Lane 10: 5-HT5B, Lane 11: 5-HT6, Lane 12: 5-HT7,
Lane M: DNA markers(bp).

期の反応と比較すると顕著に増加した。また、エナメル芽細胞層、象牙芽細胞層では根尖に近い未分化な細胞に陽性反応が認められた (Fig. 4 b, c, d)。

2. 5-HT_{2B} 受容体アンチセンス鎖を用いた *in situ* hybridization の所見

星状網細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞層および歯乳頭間葉細胞にシグナルが認められた (Fig. 4 e)。このうちエナメル芽細胞層および象牙芽細胞層では根尖周囲の未分化な細胞では顕著な陽性反応を示し、細胞の分化とともにシグナルが弱まり、成熟したエナメル芽細胞、象牙芽細胞では反応は弱かった (Fig. 4 f, g, h)。

なお 5-HT_{2B} 受容体センス鎖を用いた反応では特異的なシグナルは観察されなかった。

Ⅲ. 下顎第一臼歯における 5-HT の局在および 5-HT_{2B} 受容体の mRNA の発現

A. 蕾状期歯胚

歯胚および周囲の歯乳頭間葉細胞に、5-HT の局在、5-HT_{2B} 受容体の mRNA の発現は認められなかった (Fig. 5 a, b)。

B. 帽状期歯胚

1. 5-HT 局在の免疫組織学的染色所見

内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、星状網細胞および歯乳頭間葉細胞はいずれも 5-HT の局在を示し、特に内エナメル上皮細胞に明瞭な陽性反応が認められた (Fig. 6 a)。

2. 5-HT_{2B} 受容体アンチセンス鎖を用いた *in situ* hybridization の所見

内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、星状網細胞および歯乳頭間葉細胞のいずれにも 5-HT_{2B} 受容体の mRNA のシグナルが認められた (Fig. 6 b)。

5-HT_{2B} 受容体センス鎖を用いた反応では、特異的なシグナルは観察されなかった (Fig. 6 c)。

C. 鐘状期歯胚

1. 5-HT 局在の免疫組織学的染色所見

外エナメル上皮細胞、星状網細胞、中間層細胞および歯乳頭間葉細胞に反応が認められた。歯乳頭間葉細胞の反応は帽状期の反応と比較すると顕著に増加した。エナメル芽細胞層および象牙芽細胞層では根尖に近い未分化な細胞に免疫反応が認められ、分化が進み成熟エナメル芽細胞、成熟象牙芽細胞になると免疫反応が弱くなった (Fig. 7 a, b)。

2. 5-HT_{2B} 受容体アンチセンス鎖を用いた *in situ* hybridization の所見

外エナメル上皮細胞、星状網細胞、中間層細胞、歯乳

頭間葉細胞にシグナルが認められた。エナメル芽細胞層および象牙芽細胞層では、根尖周囲の未分化な細胞では陽性反応を示し、分化が進むに従いシグナルが弱まった (Fig. 7 c, d)。

なお 5-HT_{2B} 受容体センス鎖を用いた反応では特異的なシグナルは観察されなかった (Fig. 7 e)。

考 察

神経伝達物質として知られているセロトニン (5-HT) およびその受容体であるセロトニン受容体 (5-HT 受容体) が、歯の発生を含む頭蓋顎顔面の形態形成に関与していることが報告されている^{5-9, 11, 24)}。しかしながら、*in vivo* における歯胚の 5-HT の局在および 5-HT 受容体の発現を検索した報告はない。そこで本研究では、歯胚に発現する 5-HT 受容体のサブタイプを RT-PCR 法により検索した。さらにラット下顎切歯および下顎第一臼歯歯胚における 5-HT の局在を免疫組織化学的に、形態形成に関係する 5-HT_{2B} 受容体の mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検索した。

免疫染色および *in situ* hybridization 法の結果から切歯、臼歯とも蕾状期歯胚には 5-HT の局在、5-HT_{2B} 受容体の発現はともに認められなかったが、帽状期歯胚になるとリガンドの局在とそのレセプターの発現を認めた。5-HT はセロトニントランスポーター (5-HTT) により細胞内に取り込まれる²⁵⁾。Hansson ら (1999)²⁶⁾ は発生中のラット胚における 5-HTT の mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検索し、胎生 17 日以降胎生 21 日まで歯胚に 5-HTT の mRNA の発現を認めたことを報告した。また、胎生 16 日までは 5-HTT の発現は認められなかった。さらに Moiseiwitch ら (1996)¹¹⁾ は、培地に 5-HT を添加して歯胚を培養すると培地に加えた 5-HT の濃度に比例して歯胚の発生が進むこと、5-HT 取り込み阻害剤であるフルオキセチンを培地に添加すると、歯胚に 5-HT が取り込まれず歯胚の分化が阻害されたと報告した。培養系の実験では 5-HT は培地から供給され歯胚に取り込まれるが、*in vivo* においては 5-HT は母体から胎盤を通じて供給され歯胚に取り込まれる²⁷⁾。以上のことから、本研究で認められた抗 5-HT 抗体陽性細胞は、母体から供給された 5-HT を 5-HTT により選択的に取り込んだ細胞であると考えられる。5-HT が歯胚の発生に関与しており、歯胚の発生には歯胚の細胞が 5-HT を取り込むことが必要である。

歯胚の細胞に取り込まれた 5-HT は開口放出により

細胞外に分泌され、5-HT 受容体を介して生理活性を発揮すると考えられる。本研究において RT-PCR 法により歯胚に 5-HT_{2B}, 3, 6, 7 受容体が発現することが示された。Choi ら (1997)¹⁰⁾ は、5-HT_{2B} レセプターのアンタゴニストであるリタンセリンを培地に添加してマウス胚を培養すると顎部、心臓、神経管に形成異常が生じたと報告し、5-HT_{2B} 受容体が頭蓋顎顔面の形態形成に関与することを示した。本研究の *in situ* hybridization 法の結果においても、この 5-HT_{2B} 受容体が帽状期以降の歯胚に認められた。5-HTT により歯胚の細胞内に 5-HT が高濃度に取り込まれ、その 5-HT が開口放出により分泌され 5-HT_{2B} 受容体を介して歯胚の発生に関与していることが推測できる。

5-HT が神経堤細胞や心内膜、心筋の細胞の移動および増殖に関係するという報告がある²⁸⁻³⁰⁾。Yavarone ら (1993)²⁹⁾ はマウス胚を培養し心臓への ³H-thymidine の取り込みを報告した。彼らは培地にフルオキセチンを加えると心内膜、心筋の細胞への ³H-thymidine の取り込みが阻害されること、5-HT の濃度依存的に細胞の移動が誘導されることを示した。歯胚の発生においても 5-HT が細胞の移動、増殖に関与しているのではないかと推測される。

切歯、臼歯ともに帽状期歯胚から生後 1 日の歯胚へ発生が進むと 5-HT の局在部位、5-HT_{2B} 受容体の mRNA の発現部位がほぼ一致した。切歯のエナメル芽細胞層、象牙芽細胞層のうち上皮細胞の幹細胞であると考えられているサービカルループ^{23, 31)} 周囲の上皮細胞、未分化間葉細胞に抗 5-HT 抗体陽性反応、5-HT_{2B} 受容体の mRNA の発現がともに認められた。しかし、その反応は細胞の分化が進むとともに弱くなり、成熟したエナメル芽細胞、象牙芽細胞では 5-HT の局在および 5-HT_{2B} 受容体の mRNA の発現は認めなかった。臼歯においても同様な結果を示し、ヘルトビッヒ上皮鞘周囲の上皮細胞、未分化な間葉細胞では 5-HT、5-HT_{2B} 受容体ともに陽性反応を示し、細胞の分化が進むとともに反応が弱くなった。以上の結果から 5-HT および 5-HT_{2B} 受容体がエナメル芽細胞、象牙芽細胞の増殖や分化に関与している可能性が考えられる。これは Moiseiwitch ら (1996)¹¹⁾ が報告した、5-HT 取り込み阻害剤フルオキセチンによる歯胚の成長抑制の結果と一致する。

5-HT が歯胚の発生に直接的に関与するのか、他の因子を介して間接的に働くかは明らかでない。胎生 12 日のマウスの下顎から取り出した間葉細胞を 5-HT を添加した培地で細胞培養すると、軟骨プロテオグリカンコ

アタンパク、テネシンおよびカルシウム結合タンパク S-100 β の発現量に変化が見られたという報告がある³²⁾。歯胚においても 5-HT がこれらの形態形成に関わる分子の発現を調節して、歯胚の発生に間接的に関与しているのかもしれない。

本研究において、歯胚における 5-HT の局在、形態形成に係る 5-HT_{2B} 受容体の mRNA の発現を明らかにした。歯の発生における 5-HT の役割を明らかにするためには、5-HT の分泌の制御機構や 5-HT 受容体の細胞内情報伝達系の解明が必要であろう。

結 論

歯胚に発現する 5-HT 受容体のサブタイプを RT-PCR 法により検索した。さらにラット下顎切歯および下顎第一臼歯歯胚における 5-HT の局在を免疫組織化学的に、形態形成に係る 5-HT_{2B} 受容体の mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検索した。

1. RT-PCR 法により生後 1 日のラットの下顎切歯歯胚に 5-HT_{2B}, 3, 6, 7 受容体の mRNA が発現した。

2. 切歯、臼歯とも蕾状期歯胚には 5-HT の局在、5-HT_{2B} 受容体の発現はともに認められなかった。

3. 切歯、臼歯とも帽状期になると 5-HT の局在、5-HT_{2B} の発現を認めた。抗 5-HT 抗体に対する反応が内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、星状網細胞および歯乳頭間葉細胞に認められ、とくに内エナメル上皮細胞に強い陽性反応を示した。同様に 5-HT_{2B} 受容体の mRNA のシグナルがエナメル器の細胞、歯乳頭間葉細胞に認められ、特に歯乳頭間葉細胞は顕著な陽性反応を示した。

4. 切歯、臼歯とも生後 1 日の歯胚では 5-HT、5-HT_{2B} 受容体ともに星状網細胞、中間層細胞および歯乳頭間葉細胞に反応が認められた。エナメル芽細胞層、象牙芽細胞層のうち根尖に近い未分化な上皮細胞、未分化な間葉細胞に抗 5-HT 抗体陽性反応、5-HT_{2B} 受容体の発現がともに認められた。しかし、その反応は細胞の分化とともに弱くなり成熟したエナメル芽細胞、象牙芽細胞では 5-HT の局在および 5-HT_{2B} 受容体の mRNA の発現は認められなかった。

以上の結果、5-HT および 5-HT_{2B} 受容体が歯胚の発生に関与していると考えられる。

稿を終えるにあたり、終始御指導と御高閲を賜りました九州歯科大学歯科保存学第 1 講座寺下正道教授ならびに口腔解剖学第 2 講座豊島邦昭教授に深甚なる感謝の意

をあらわします。また、御懇切な御助言御指導を下さいました口腔解剖学第2講座原田英光助教授および歯科保存学第1講座北村知昭助手に心より感謝申し上げます。さらに、研究の遂行に御協力を賜りました歯科保存学第1講座的各教室員と口腔解剖学第2講座的各教室員に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 吉岡充弘: セロトニン受容体. Bio Science 用語ライブラリー (御子柴克彦編). 羊土社, 東京, 1997, 94-95.
- 2) 吉岡充弘: セロトニン受容体. 生体の科学 49: 362-364, 1998.
- 3) Boess F. G. and Martin I. L.: Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 33: 275-317, 1994.
- 4) 吉岡充弘: セロトニン受容体. 生体の科学 49: 342, 1998.
- 5) Lauder J. M., Tamir H. and Sadler T. W.: Serotonin and morphogenesis I. Sites of serotonin uptake and -binding protein immunoreactivity in the mid-gestation mouse embryo. *Development* 102: 709-720, 1988.
- 6) Lauder J. M. and Zimmerman E. F.: Sites of serotonin uptake in epithelia of the developing mouse palate, oral cavity and face: possible role in morphogenesis. *J. Cranio. Gen. Dev. Biol.* 8: 265-276, 1988.
- 7) Buznikov G. A., Shmukler Y. B. and Lauder J. M.: From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell. Mol. Neurobiol.* 16: 533-559, 1996.
- 8) Shuey D. L., Sadler T. W. and Lauder J. M.: Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology* 46: 367-378, 1992.
- 9) Shuey D. L., Sadler T. W., Tamir H. and Lauder J. M.: Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anat. Embryol.* 187: 75-85, 1993.
- 10) Choi D. -S., Ward S. J., Messaddeq N., Launay J. -M. and Maroteaux L.: 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* 124: 1,745-1,755, 1997.
- 11) Moiseiwitsch J. R. D. and Lauder J. M.: Stimulation of murine tooth development in organotypic culture by the neurotransmitter serotonin. *Arch. Oral Biol.* 41: 161-165, 1996.
- 12) Albert P. R., Zhou Q. Y., VanTol H. H. M., Bunzow J. R. and Civelli O.: Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene. *J. Biol. Chem.* 265: 5,825-5,832, 1990.
- 13) Fujiwara Y., Nelson D. L., Kashiwara K., Varga E., Roeske W. R. and Yamamura H. I.: The cloning and sequence analysis of the rat serotonin-1A receptor gene. *Life Sci.* 47: 127-132, 1990.
- 14) Hamblin M. W., McGuffin R. W., Metcalf M. A., Dorsa D. M. and Merchant K. M.: Distinct 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} serotonin receptors in rat: structural and pharmacological comparison of the two cloned receptors. *Molec. Cell. Neurosci.* 3: 578-587, 1992.
- 15) Levenberg T. W., Erlander M. G., Baron B. M., Racke M., Slone A. L., Siegel B. W., Craft C. M., Burns J. E., Danielson P. E. and Sutcliffe J. G.: Molecular cloning and functional expression of 5-HT_{1D}-like rat and human 5-hydroxytryptamine receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 2, 184-2, 188, 1993.
- 16) Julius D., Huang K. N., Livelli T. J., Axel R. and Jessel T.: The 5-HT₂ receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 928-932, 1990.
- 17) Kursar J. D., Nelson D. L., Wainscott D. B., Cohen M. L. and Baez M.: Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of a novel serotonin receptor (5-hydroxytryptamine 2F) from rat stomach fundus. *Molec. Pharmacol.* 42: 549-557, 1992.
- 18) Julius D., MacDermott A. B., Axel R. and Jessel T.: Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* 241: 558-564, 1988.
- 19) Isenberg K. E., Ukhun I. A., Holstad S. G., Uchida U., Zorumski C. F. and Yang J.: Partial cDNA cloning and NGF regulation of a rat 5-HT₃ receptor subunit. *NeuroReport* 5: 121-124, 1993.
- 20) Erlander M. G., Lovenberg T. W., Baron B. M., De Lecea L., Danielson P. E., Racke M., Slone A. L., Siegel B. W., Foye P. E., Cannon K., Burns J. E. and Sutcliffe J. G.: Two member of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3,452-3,456, 1993.
- 21) Monsma F. J., Shen Y., Ward R. P., Hamblin M. W. and Sibley D. R.: Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Molec. Pharmacol.* 43: 320-327, 1993.
- 22) Shen Y., Monsma F. J., Metcalf M. A., Jose P. A., Hamblin M. W. and Sibley D. R.: Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine 7 serotonin receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 268, 18,200-18,204,

- 1993.
- 23) Kettunen P. and Thesleff I.: Expression and function of FGFs-4, -8, and 9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev. Dyn.* 211: 256-268, 1998.
  - 24) Moiseiwitsch J. R. D., Raymond J. R., Tamir H., and Lauder J. M.: Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explant cultures. *Arch. Oral Biol.* 43: 789-800, 1998.
  - 25) 島田昌一: セロトニントランスポーター. *Bio Science 用語ライブラリー* (御子柴克彦編). 羊土社, 東京, 1997, 120-121.
  - 26) Hansson S. R., Mezey E. and Hoffman B. J.: Serotonin transporter messenger RNA expression in neural crest-derived structures and sensory pathways of the developing rat embryo. *Neuroscience* 89: 243-265, 1999.
  - 27) Yavarone M. S., Shuey D. L., Sadler T. W. and Lauder J. M.: Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse. *Placenta* 14: 149-161, 1993.
  - 28) Moiseiwitsch J. R. D. and Lauder J. M.: Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 7, 182-7, 186, 1995.
  - 29) Yavarone M. S., Shuey D. L., Tamir H., Sadler T. W. and Lauder J. M.: Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* 47: 573-584, 1993.
  - 30) Lauder J. M.: Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* 16: 233-240, 1993.
  - 31) Harada H., Kettunen P., Jung H-S., Mustonen T., Wang Y. A. and Thesleff I.: Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J. Cell. Biol.* 147: 105-120, 1999.
  - 32) Moiseiwitsch J. R. D. and Lauder J. M.: Regulation of gene expression in cultured embryonic mouse mandibular mesenchyme by serotonin antagonists. *Anat. Embryol.* 195: 71-78, 1997.

Fig. 2 The tooth germ of the rat incisor at the bud stage.
No 5-HT(a) and no 5-HT2B mRNA(b) were detected.

Fig. 3 Distribution of 5-HT(a) and 5-HT2B mRNA(b) in the tooth germ of the rat incisor at the cap stage, and control experiment(c) using a 5-HT2B senseRNA probe.

Fig. 4 Distribution of 5-HT(a) and 5-HT2B mRNA(e) in the tooth germ of the rat incisor at postnatal day-1.

b, c, d : higher-magnification of Fig. 4 a.

f, g, h : higher magnification of Fig. 4 e.

Note that intense staining for 5-HT and 5-HT 2 B mRNA are detected in immature epithelial cells and mesenchymal cells(b, f) ; the signal decrease in mature ameloblasts and odontoblasts(d, h).

CL : Cervical loop
A : Ameloblasts
O : Odontoblasts
SR : Stellate reticulum
SI : Stratum intermedium

Fig. 5 The tooth germ of the rat molar at the bud stage.
No 5-HT(a) and no 5-HT2B mRNA(b) were detected.

Fig. 6 Distribution of 5-HT(a) and 5-HT2B mRNA(b) in the tooth germ of the rat molar at the cap stage, and control experiment(c) using a 5-HT2B senseRNA probe.

Fig. 7 Distribution of 5-HT(a) and 5-HT2B mRNA(c) in the tooth germ of the rat molar at the bell stage.

b: higher magnification of Fig. 7 a.

d: higher magnification of Fig. 7 c.

e: control experiment using a 5-HT2B senseRNA probe.

Note that intense staining for 5-HT and 5-HT2B mRNA are detected in immature epithelial cells and mesenchymal cells (a,c); the signal decrease in mature ameloblasts and odontoblasts(b,d).