

論文内容要旨

線維芽細胞増殖因子受容体 2b シグナル減弱は
象牙芽細胞の分化および象牙質形成を促進させる

— Attenuation of fibroblast growth factor receptor 2b
signaling promotes odontoblast differentiation and
dentin formation —

主指導教員：津賀 一弘教授

(医歯薬保健学研究科 先端歯科補綴学)

副指導教員：吉子 裕二教授

(医歯薬保健学研究科 硬組織代謝生物学)

副指導教員：谷本 幸太郎教授

(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

横井 美有希

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

マウス切歯は形成端に幹細胞を有し一生涯伸長するため、歯の形成・形態維持のメカニズムを知る上で大変有用な実験モデルとされている。これまでマウス切歯形成端の **apical bud** に存在する幹細胞は、間葉組織に存在する線維芽細胞増殖因子 (FGF) 3 および 10 と、上皮組織に存在する FGF9 が相互に作用しながら維持されることが報告されている。また、FGF 受容体 (FGFR) 2b シグナル減弱は口腔上皮由来幹細胞のエナメル芽細胞への分化を抑制するものの、幹細胞自体の生存には影響しないことが明らかとなっている。しかしながら FGFR2b シグナル減弱が、歯の主たる構成要素である象牙質形成に与える影響については未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、FGFR2b シグナル減弱が象牙芽細胞分化および象牙質形成に与える影響について明らかにすることを目的とした。

実験動物は、テトラサイクリン系抗生物質ドキシサイクリン (DOX) 含有飼料投与により FGFR2b の可溶性変異体 (sFGFR2b) を産生することでリガンド (FGF1, 3, 7, 10, 22) と結合し、誘導的かつ可逆的に FGFR2b シグナルを減弱させることが可能な遺伝子改変マウス (CMV) を使用した。対照として同腹仔の野生型マウス (WT) を用いた。

実験 1 では FGFR2b シグナル減弱がマウス切歯形成に与える影響について、実験 2 では FGFR2b シグナル減弱が歯髄組織に与える影響について、実験 3 では、sFGFR2b 過剰発現が歯髄幹細胞に与える影響について検討を行った。

実験 1-1 では、出生直後 (P0) から 4 週間 DOX 含有飼料を投与し P33 に安楽死させたマウス (CMV : n = 4, WT : n = 4) の下顎骨を採取し、HE 染色および免疫化学染色 (biglycan) を行い、CMV および WT にて象牙質に対する象牙前質の割合 (%) を解析した。

実験 1-2 では、P0 から 4 および 8 週間 DOX 含有飼料を投与し P33 (CMV : n = 6, WT : n = 5) および P56 (CMV : n = 4, WT : n = 4) に安楽死させたマウスから下顎骨を採取し、 μ CT 解析を行った。

実験 2 では、P14 から 2 週間 (CMV : n = 3, WT : n = 2) および 4 週間 (CMV : n = 3, WT : n = 3) DOX 含有飼料を投与したマウスの下顎切歯の歯髄組織より RNA を抽出し、象牙質関連分化マーカー (*DSPP*, *nestin*, *OCN*, *RUNX2*, *ALP*) および *GAPDH* を用いて遺伝子発現解析を行った。

実験 3 では、8-10 週齢のマウス (CMV : 10 匹, WT : 12 匹) の下顎切歯歯髄よりマウス歯髄幹細胞 (DPSCs) を単離した。実験 3-1 では、CFU-F 解析により単離した DPSCs の細胞特性を確認した。実験 3-2 では、単離した DPSCs を継代培養後、DOX (100 ng/ml) 添加石灰化誘導培地にて 2 週間培養し、CMV および WT の細胞から RNA を抽出、実験 2 と同様に遺伝子発現解析を行った。

統計解析は、実験 1 および 3 では Student's *t* 検定を、実験 2 では 1 変量 2 要因の分散分析を用い、有意水準は 5 % として行った。

実験 1-1 の組織学的検討において、WT, CMV とともに形成端に **apical bud** が観察された。一方で、CMV ではエナメル質の消失、象牙芽細胞配列の乱れ、象牙細管構造が不規則になっていることが観察された。さらに、免疫化学染色により象牙質に対する象牙前質の割合を比較した結果、

CMVにおいて有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。実験 1-2 の μ CT 解析では、実験 1-1 の結果と同様に 4 および 8 週間 DOX 投与の CMV において、エナメル質の消失を観察した。象牙質の厚みは、4 週間 DOX 投与した CMV では第一臼歯部切歯、8 週間 DOX 投与した CMV では第一臼歯部切歯および 1.5 mm 近心位の切歯において、WT よりも有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。以上の結果から、FGFR2b シグナル減弱は、象牙質への分化および石灰化を促進させることが明らかとなった。

実験 2 の歯髄組織の遺伝子発現解析では、CMV では、DOX 投与 2 週間において、*DSPP*, *nestin* および *OCN* の発現量が WT と比較して有意に高い値を示した。これに対して、*RUNX2* および *ALP* の発現量には CMV と WT の間に有意な差は見られなかった。また、DOX 投与 4 週間では WT の *ALP* 発現量が CMV よりも有意に高い値を示したものの、*DSPP*, *nestin*, *OCN* および *RUNX2* では CMV と WT の間には有意な差は見られなかった。以上の結果から、FGFR2b シグナル減弱は、早期において象牙質特異的に分化を誘導し、象牙質石灰化を促進させることが明らかとなった。

実験 3-1 において単離した両群間の細胞には、細胞特性に差が無いことを確認した。実験 3-2 では、sFGFR2b を過剰発現させた状態で DPSCs に 2 週間石灰化誘導をかけ遺伝子発現解析を行った結果、*RUNX2* および *ALP* は WT と比較して CMV において有意に高い値を ($P < 0.01$)、*DSPP*, *nestin* および *OCN* では、CMV と比較して WT において有意に高い値 ($P < 0.05$) を示し、実験 2 の結果とは相反する結果を得た。この結果から、sFGFR2b 過剰発現によるリガンド捕捉は、間葉系幹細胞である歯髄幹細胞に対して、象牙質分化を促進させないことが示唆された。

以上の結果から、切歯形成端において上皮組織への FGFR2b シグナル減弱は、Apical bud から間葉系細胞（歯髄幹細胞および歯髄組織）へのサイトカインや細胞表面分子によるシグナル伝達の減弱および変化を引き起こし、早期の象牙芽細胞の分化および象牙質石灰化を促進させることが明らかとなった。