

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17344

研究課題名（和文）薬剤性歯根形成障害に対する幹細胞投与療法の可能性

研究課題名（英文）Potential effect of the stem cell therapy on drug-induced anomalies of tooth root.

研究代表者

中村 雅子（Nakamura, Masako）

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：70781102

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：小児悪性腫瘍に対する大量化学療法は、歯の形態異常、歯根形成異常などの晩発障害を惹起する。本研究では、シクロホスファミド（CPA）投与による歯根形成への影響をマウスで検討した。高濃度CPA投与群では、根尖孔の早期閉鎖に伴う短根化が認められた。さらに、マウスHertwig's上皮鞘（HERS）細胞へのCPA投与により、濃度依存的にHERS細胞の増殖が減少し、E-cadherin発現低下による細胞接着性の抑制が明らかとなった。これらの結果は、CPA投与による短根形成は、歯根形成を担うHERS細胞の上皮間葉転換促進によるHERS細胞の早期断片化が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児癌治療によって歯の形成が停止した小児に対しては、暫間義歯などの補綴修復物による限られた対応しかできない。しかし、抗がん剤治療による歯の形成不全メカニズムが解明できれば、抗がん剤投与後の歯の萌出異常などの晩発障害に対し新たな対応を提案できると考えた。本研究課題では、抗がん剤投与マウスを作製し、抗がん剤治療による短根化メカニズムの一端を明らかにした。これらの成果は、乳歯列・混合歯列期に抗がん剤治療を受ける小児に対し、晩発障害を小さくできる可能性を高めるとともに歯の再生研究への基礎研究にもなり得る。

研究成果の概要（英文）：Chemotherapy with higher doses causes dental anomalies, such as hypodontia, microdontia, and atypical root formation, in children with malignant tumors.

This study examined whether potential harmful effect of cyclophosphamide (CPA) on tooth development leads to atypical root formation in mice. Mice treated with higher doses of CPA showed an arrested root development due to early apical foramen closure. Hertwig's root sheath cell line (HERS) cells cultured with higher doses of CPA revealed decreased expression of E-cadherin, while N-cadherin expression was upregulated, indicating that this cadherin switch may facilitate an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-like phenomenon. These findings suggest that administration of high doses of CPA can lead to arrest in root development, due to EMT of HERS cells during root development.

研究分野：小児歯科学

キーワード：小児悪性腫瘍 シクロホスファミド Hertwig's上皮鞘 上皮間葉形質転換

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児悪性腫瘍の治療方法の急速な進歩により、治療成績は飛躍的に向上し、長期生存が可能となった。しかしながら、抗がん剤を使用した大量化学療法は、発育期にある小児に対して、種々の晩期障害を発症することも知られてきた。歯においては、硬組織の形成障害や埋伏などがある(小児歯誌 2003)。歯の埋伏や萌出停止は、寛解状態にある小児の生涯にわたる QOL に大きな影響を与える。大量化学療法による歯の形成は、その後ゆっくりと成長するものもあれば、停止に陥るものもあり、薬剤感受性が歯の発生段階によって異なっていることを示している。歯根の形成不全および萌出遅延はヘルトヴィッヒ上皮鞘(HERS)と間葉系組織の相互作用不全により生じる。大量化学療法によるこれらの障害は、歯冠および歯根形成プロセスの停止によるものである。その障害のターゲットが、歯原性上皮であるか、間葉であるのかは、現在までのところ不明である。

### 2. 研究の目的

N-マスタード誘導体アルキル化薬シクロホスファミド(CPA)は、小児白血病などの多剤併用療法のひとつとして広く使用されている。CPAは生体内で活性化された後、腫瘍細胞のDNA合成を阻害し、抗腫瘍作用を示す。本研究においては、CPAが歯の発生に与える影響について詳細に解析し、形成停止の原因を明らかにすることで、「形成停止に陥った歯の形成を再開」を目的とした。

### 3. 研究の方法

大量化学療法が歯胚形成の停止させるメカニズムの解明

#### 1) *In vivo* 実験

##### a. 抗がん剤投与によるマウス歯根形成停止モデルの作製

ICRマウスにCPA 50, 100, 200mg/Kgの各濃度で、生後3, 6, 9日目に腹腔内投与を行い、生後14, 21, 28日、それぞれの日齢において下顎第一臼歯の経日的変化を観察した。

##### b. 全身的影響の観察

生後14, 21, 28日において、体毛の状態の確認、体重測定を行った。

##### c. $\mu$ CTによる下顎第一臼歯の歯根長と根尖孔の解析

$\mu$ CTにて下顎第一臼歯の撮影を行った。歯根長として、下顎第一臼歯の近心根のセメントエナメルジャンクションから歯根形成端までの長さを測定し、根尖孔の長径としては、下顎第一臼歯近心根の近遠心幅径を測定し比較検討した。

##### d. ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)による第一臼歯歯根尖部の組織学的解析

10%中性ホルマリンにて固定後、ギ酸にて脱灰した。通法に従い、パラフィン包埋を行い、5 $\mu$ m切片の作製を行った。切片は、HE染色にて観察した。

#### 2) *In vitro* 実験

##### e. CPA刺激下でのマウス Hertwig's epithelial root sheath 由来細胞株(HERS01a細胞)の培養

3~6継代目のHERS01a細胞をサブコンフルエントまで培養後、CPAを0.18, 0.36, 0.72 $\mu$ Mの各濃度を培地に添加し48時間刺激した。

##### f. Western Blotting法によるタンパク発現の検索

抗体は、上皮系のマーカーであるE-cadherin, 間葉系のマーカーであるN-cadherinを使用し、ウェスタンブロットは、iBind Western System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いた。

##### g. 細胞免疫化学染色にてタンパク質の局在の検索

HERS01a細胞を10wellスライド上で培養し、通法に従い固定し、ウェスタンブロットで用いた抗体で染色した。各一次抗体は、4時間一晩作用させ、2次抗体を45分作用させた後、DAPIにて核染色し、蛍光顕微鏡にて用いて観察した。

### 4. 研究成果

#### 1. CPA投与による全身的影響

200mg/Kg群においては、脱毛を認め(図1A)、体重変化においても、200mg/Kg群に有意の体重減少を認めた(図1B)。

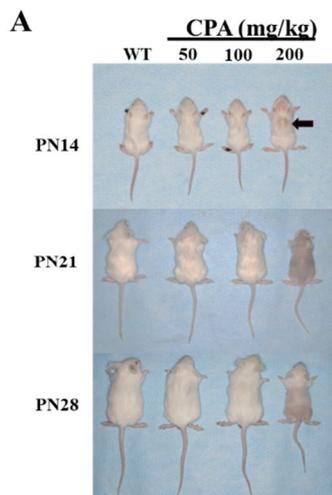


図 1A 対照群と CPA 投与群の全身的観察

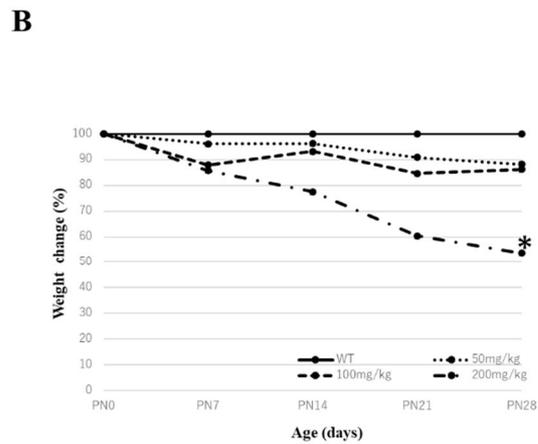


図 1B CPA 投与による体重減少

Matsuo et al. Journal of Hard Tissue Biology. 2020

2.  $\mu$ CT による下顎第一臼歯の歯根長と根尖孔の解析

歯根長は、各濃度群において経日的に増加を示した。また、対照群と CPA 50, 100mg/Kg 群においては、歯根長に有意差は認められなかった。200mg/Kg 群の生後 14, 21, 28 日齢においては、対照群と比較して有意に短くなり、28 日齢では 65% 程度歯根長が短い結果を示した (図 2)。

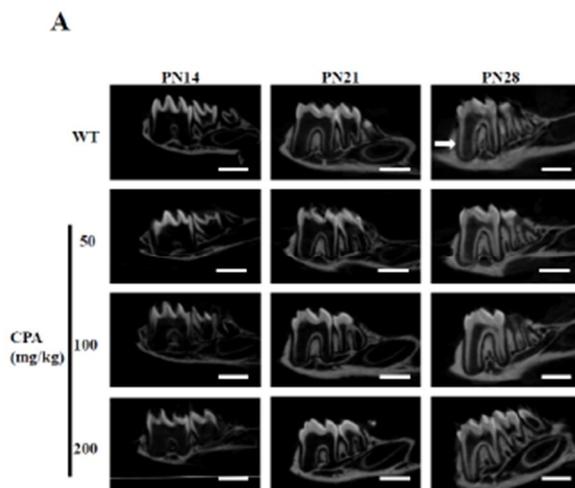


図 2A 下顎第一臼歯の歯根長の  $\mu$ CT 画像

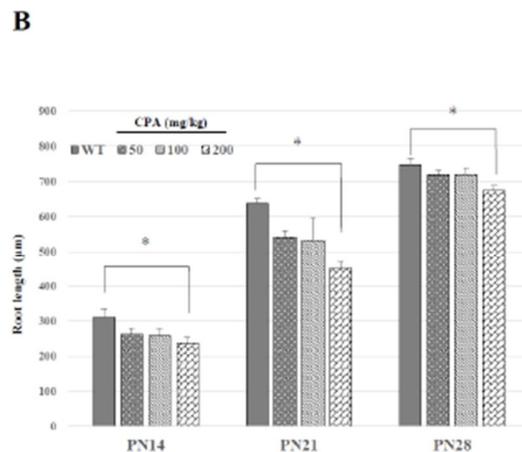


図 2B 下顎第一臼歯の歯根長の経日的変化量

Matsuo et al. Journal of Hard Tissue Biology. 2020

根尖孔においては、すべての実験群で経日的に根尖孔の閉鎖を認めた。200mg/kg 群は、対照群と比較して、14, 21 日齢に有意的な根尖孔の閉鎖を認めたが、28 日齢においては、根尖孔長径に有意差は認めなかった (図 3)。

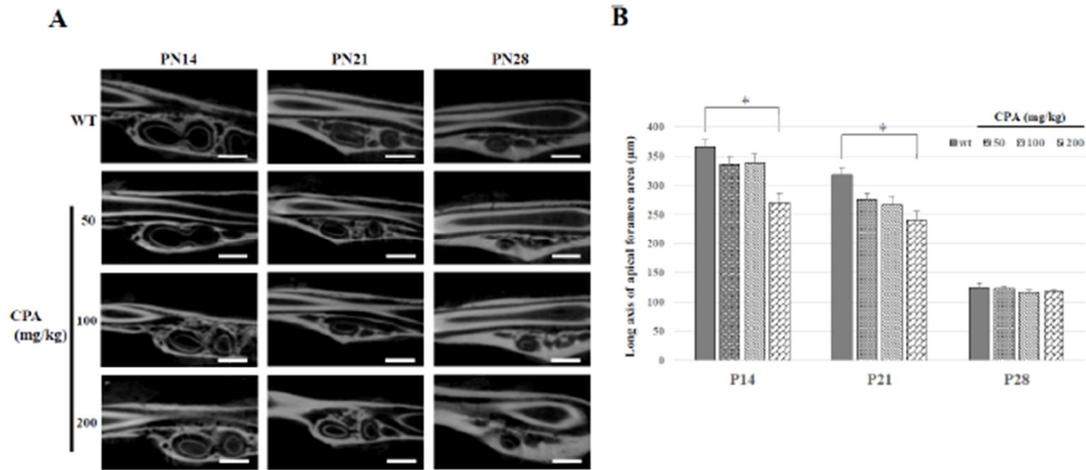


図 3A 下顎第一臼歯の根尖孔の  $\mu$ CT 画像

図 2B 下顎第一臼歯の根尖孔の経日的変化量

*Matsuo et al. Journal of Hard Tissue Biology. 2020*

### 3. HE 染色による第一臼歯根尖部の組織学的解析

生後 14 日齢においては、全群において、根尖の閉鎖は認めず、21 日齢においては、200mg/Kg 群のみに根尖孔の早期閉鎖傾向を示した（図 4 黄色矢印）。28 日齢では、全群に根尖の閉鎖傾向を認めたが、CPA 投与群においては、対照群と比較して、より根管の狭窄を示し、200mg/Kg 群においては、根管の閉鎖をも認めた（図 4）。

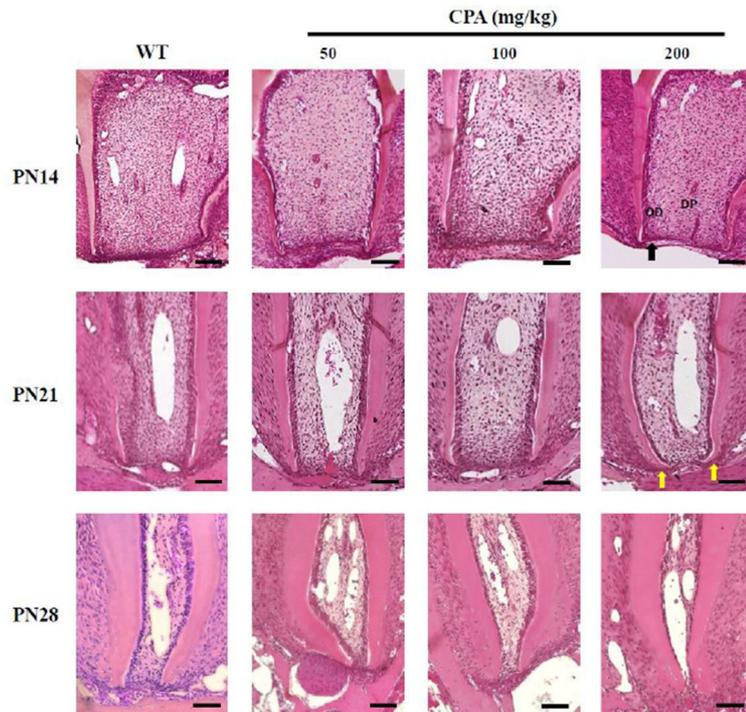


図 4 HE 染色による第一臼歯根尖部の組織学的変化

*Matsuo et al. Journal of Hard Tissue Biology. 2020*

### 4. CPA 刺激下での HERS01a 細胞の動態変化

CPA 刺激によって HERS01a 細胞のタンパク質の発現が変化するかを Western Blotting 法にて検索した結果、対照群では、E-カドヘリンを発現し、N-カドヘリンの発現はほとんど認めなかった。CPA 刺激群では E-カドヘリンの発現は、CPA 濃度の増加とともに徐々に減少し、0.36 $\mu$ M、0.72 $\mu$ M 群では他のグループと比較して、E-カドヘリン発現の顕著な減少が観察され、CPA 刺激が HERS01a 細胞の細胞間接着の喪失を誘発していることが示唆された。

対照的に、N-カドヘリン発現は、中・高濃度の CPA で処理された HERS01a 細胞で発現しており、E-カドヘリンの発現が減少しているために細胞間接着の障害を示す細胞は、N-カドヘリン発現の増加の影響を受けやすい可能性も示唆された (図 5)。

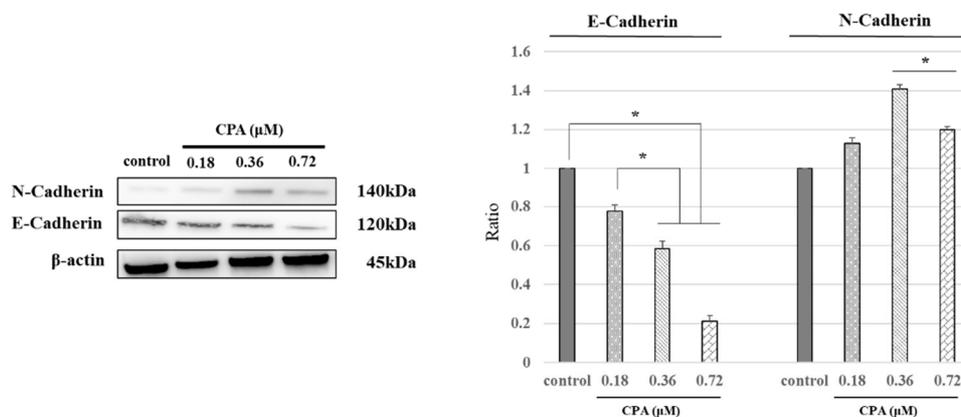


図 5 CPA 刺激下における HERS01a 細胞のタンパク質発現量の変化  
Matsuo et al. Journal of Hard Tissue Biology. 2020

更に、E-カドヘリンと N-カドヘリンの局在を細胞免疫化学染色にて検索した結果、対照群では、敷石状の HERS01a 細胞が E-カドヘリンを発現し、N-カドヘリンの発現は認めなかった。E-カドヘリンの発現は、CPA 濃度の増加とともに HERS01a 細胞で徐々に減少し、N-カドヘリンの発現は 0.36 および 0.72 M で顕著に観察された (図 6)。

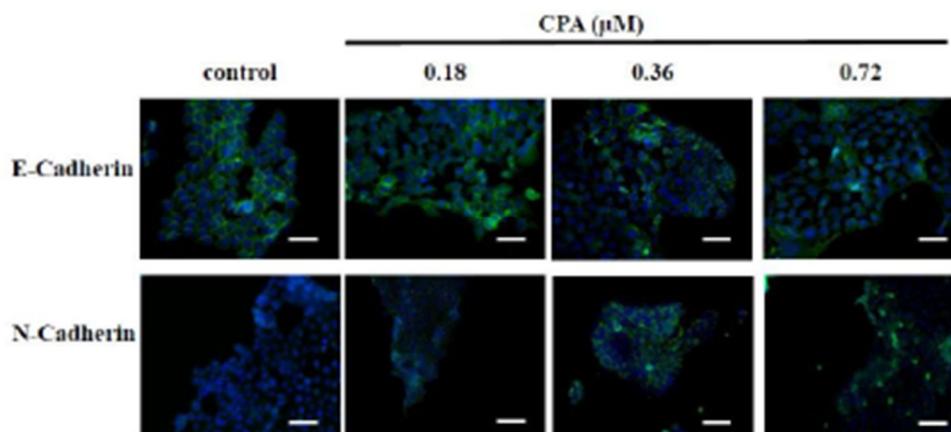


図 6 CPA 刺激下における HERS01a 細胞のタンパク質の局在  
Matsuo et al. Journal of Hard Tissue Biology. 2020

一連の解析から、in vivo においては、CPA 投与 ICR マウス下顎第一臼歯歯根には根尖孔の早期閉鎖および短根が認められ、歯髄側に歯根形成方向を向ける像が観察された。このことから CPA 投与により、歯根形成中の HERS において、早期に EMT が誘導されている可能性が示唆された。in vitro においては、CPA 刺激により上皮系マーカーの E-cadherin の発現は減少し、N-cadherin の発現の上昇が認められた。つまり、CPA 投与 HERS の細胞間接着が低下し、カドヘリンスイッチが誘発され、早期の EMT 様の現象を誘導し、HERS の断片化を引き起こすことで、根尖孔の早期閉鎖および短根に至ったことが示唆された。今後は、間葉系幹細胞 (MSC) と HERS01a 細胞との共培養、さらに、マウスへの幹細胞投与によって、CPA 刺激に対する EMT 機序への MSC の関与を明らかにする。また、MSC の関与による遺伝子の発現変化を明らかにすることにより、MSC を用いた HERS 細胞の抗がん剤での傷害を抑制するメカニズムを組み立てたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Satoru Matsuo, Masako Toda-Nakamura, Kyoko Oka, Hiroshi Kajiya, Kayoko Ogata, Hanako Ishii, Masao Ozaki, Jun Ohno	4. 巻 -
2. 論文標題 Cyclophosphamide Promotes Arrested Development of the Dental Root in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masako Toda-Nakamura, Kyoko Oka, Hana Harada, Kayoko Ogata, Satoru Matsuo, Mihoko Rikitake, Shirabe Ohki, Tetsuya Kumagai, Yoko Kato, Atsuko Baba, Masao Ozaki	4. 巻 1(30)
2. 論文標題 Ectopic junctional epithelium adhered to the buccal crown surface of an upper central incisor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 51-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hanako Ishii, Kaori Ishii, Jun Ohno, Masao Ozaki
2. 発表標題 Dynamic changes in HERS cells treated with chemotherapeutic drug.
3. 学会等名 2019 Korean Academy of Pediatric Dentistry
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井華子、松尾 聡、中村雅子、岡 暁子、大野 純、尾崎正雄
2. 発表標題 ヘルトヴィッヒ上皮鞘細胞の抗がん剤刺激による動態変化の検討
3. 学会等名 第46回福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾聡, 中村雅子, 岡暁子, 板家智, 石井華子, 尾崎正雄, 大野純
2. 発表標題 抗がん剤刺激によるヘルトヴィッヒ上皮鞘の IGF-1R 発現変化
3. 学会等名 第56回小児歯科全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井華子, 中村雅子, 岡暁子, 松尾聡, 尾崎正雄, 大野純
2. 発表標題 抗がん剤刺激によるヘルトヴィッヒ上皮鞘細胞の動態変化
3. 学会等名 第56回小児歯科全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾聡, 中村雅子, 岡暁子, 板家智, 石井華子, 尾崎正雄, 大野純
2. 発表標題 抗がん剤刺激によるヘルトヴィッヒ上皮鞘細胞でのIGF - 1R発現変化
3. 学会等名 第55回小児歯科全国大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考