

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24091

研究課題名（和文）シクロホスファミド投与により臼歯や頭蓋骨縫合部の形成異常に至るメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism leading to abnormal teeth and craniosynostosis by administration of cyclophosphamide

研究代表者

中津川 昂平（Nakatsugawa, Kohei）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40848248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：マウスに代表的な抗がん剤であるシクロホスファミド（CPA）を投与すると、歯の形成段階に応じて第三臼歯（M3）の歯の形成異常が生じることが知られている。本研究では歯胚形成に重要な役割を担うWntシグナルに着目し、Wntシグナルを蛍光タンパクで可視化するマウスを用い、CPAを投与することで、歯の発生過程への影響の探索を行った。結果としてはWntシグナルが歯の形成段階によって様々な部位で重要な役割を担っていることが示唆され、CPA投与直後にはWntシグナル周囲の細胞特異的に細胞死が生じることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児がん治療により顎顔面領域の晩期合併症として顎顔面形態異常や歯の形成異常が生じたという報告が増加している。しかし、小児がん治療が顎顔面領域の発生過程に与える影響については未だ不明な点が多く、更に詳細な研究が必要である。本研究では、顎顔面領域での発生に重要とされているシグナルを蛍光タンパクで可視化するマウスを用い、小児がん治療に用いられる代表的な抗がん剤をこのマウスに投与することで、顎顔面発生ならびに歯の発生過程への影響の探索を行った。本研究結果により、小児がん治療に伴う顎顔面領域の合併症に対する基礎的理解が深まり、予防法や治療法の確立に貢献する事が可能となる。

研究成果の概要（英文）：It is known that when cyclophosphamide (CPA), which is a typical anticancer drug, is administered to mice, abnormal tooth of the third molar (M3) occurs depending on the dental stage. In this study, we focused on the Wnt signal, which plays an important role in tooth germ formation, and investigated the effect on the tooth development process by administering CPA using mice that visualize the Wnt signal with fluorescent proteins. As a result, it was suggested that the Wnt signal plays an important role in various sites depending on the stage of tooth formation, and that cell death occurs specifically in the cells around the Wnt signal immediately after CPA administration.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：小児がん治療 化学療法 放射線療法 シクロホスファミド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、当教室では抗がん剤の影響を観察した研究として CPA により臼歯歯胚に形成異常が発症する細胞動態の解明 (Nakatsugawa K et al. Euro J Orthodont 2019) を行ってきた。この先行研究により、CPA 投与後に生じる臼歯の欠如は細胞死の増加と細胞増殖の減少により生

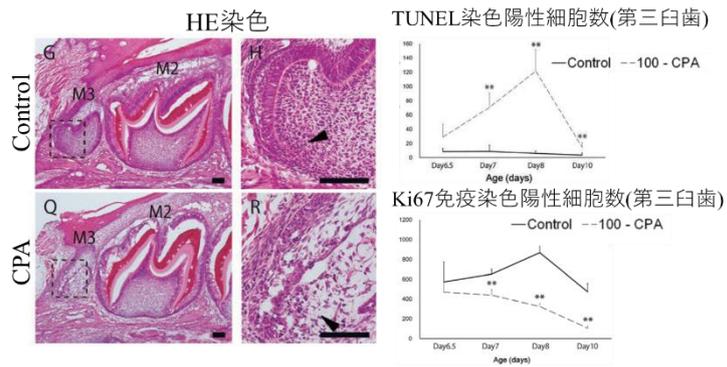


図1 臼歯歯胚におけるCPA投与後の組織学的変化と細胞動態

じ(図1), 投与時の歯胚形成段階の違いにより歯の形成異常の表現型は変化することがわかった。歯冠形態形成にはシグナリングセンターであるエナメルノットの存在が重要であることから、CPA 投与によってエナメルノットの異常が生じて歯の形成異常が生じていることが予想された。また、顎顔面形態においては、CPA 投与後のマウスにおいて顎顔面形態や頭蓋骨縫合部の異常が生じることが明らかになっており、顎顔面形態形成には頭蓋骨縫合部における骨添加が不可欠であることを考慮すると CPA 投与によって骨縫合部に変化が生じて顎顔面形態異常が生じていることが予想された。これらの事から、エナメルノットや頭蓋骨縫合部に発現するカノニカル Wnt シグナルを可視化できるマウス (R26-WntVis マウス) を用い、CPA 投与後の Wnt シグナル発現を解析することで、現在まで解明されていない抗がん剤投与による歯や頭蓋の形成異常の詳細な解析が行えるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、出生直後のR26-WntVisマウスにCPAを投与し、縫合部やエナメルノットのカノニカルWntシグナルの変化を解析することで抗がん剤投与による顎顔面形態と歯胚形態の異常のメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

【研究1】正常な顎顔面形態と臼歯発生における Wnt シグナルの発現を解明する。

① カノニカル Wnt シグナルのレポーターマウス (R26-WntVis mouse) の作製

すでに当教室にて所有している野生マウスと R26-WntVis ホモマウスを交配させ、R26-WntVis ヘテロマウスを作製する。

② R26-WntVis レポーターマウスの骨縫合部と臼歯歯胚における Wnt シグナルの観察

生後 1-10 日の R26-WntVis レポーターマウスの頭蓋骨縫合部と臼歯歯胚の Wnt シグナル発現をホールマウントあるいは凍結切片を用いて観察する。

【研究2】CPA 投与が及ぼす頭蓋骨縫合部と臼歯歯胚における Wnt シグナルへの影響を明らかにし、顎顔面形態異常と臼歯形態異常が生じる原因を解明する。顎顔面形態においては、CPA 投与による形態変化を明らかにする。

① CPA 投与後の顎顔面形態変化と頭蓋骨縫合部の観察

生後 1-10 の野生型マウスに CPA を投与し、生後 26 日と生後 52 日で頭蓋部の μ CT を撮影して骨縫合部と頭蓋形態を詳細に解析することで、頭蓋骨の骨縫合部がどのように変化してどのような頭蓋形態に至るのが明らかとなる。R26-WntVis レポーターマウスに

CPA を投与し、投与後マウスの頭蓋骨縫合部の凍結切片を観察することで、縫合部の Wnt シグナル発現の CPA 投与後の変化について解析する。

②CPA 投与後の臼歯歯胚のエナメルノットの観察

R26-WntVis レポーターマウスに CPA を投与し、投与後マウス臼歯歯胚の凍結切片を観察することで、Wnt シグナルを観察することでエナメルノットの CPA 投与後の変化について解析する。

4. 研究成果

①頭蓋骨骨縫合部の Wnt シグナル発現と CPA 投与による影響

P6 のマウスに CPA を投与し、P26 で μ CT を撮影して頭蓋骨を観察したところ、頭蓋骨の骨縫合部において、骨縫合部の癒合や離開が生じていた (図2)。そのため、後頭骨の骨縫合部に着目し、P5 の R26-WntVis マウスの凍結切片を用いて縫合部の Wnt シグナル発現を観察した (図3)。縫合部において Wnt シグナルの発現は確認されたが、縫合部に集積して発現しているわけではなかった。

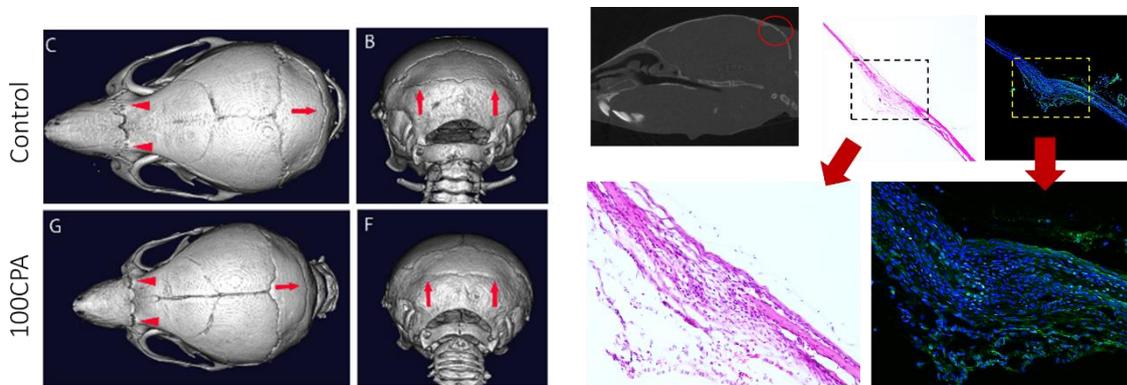


図2 CPA投与による骨縫合部の異常

図3 頭蓋の骨縫合部におけるWntシグナル発現

②臼歯と切歯における Wnt シグナル発現と CPA 投与による影響

胎生 14 日から生後 8 日の R26-WntVis マウスの臼歯を観察したところ、歯の形成段階によって GFP の局在が異なっていた。歯の形成段階の進行に伴って、一次エナメル結節、二次エナメル結節、咬頭周囲のエナメル芽細胞や象牙芽細胞、サービカルループの象牙芽細胞と順に GFP の局在が変化していくことがわかった (図4)。この結果は Wnt シグナルが歯の形成段階によって様々な部位で重要な役割を担っていることが示唆された。

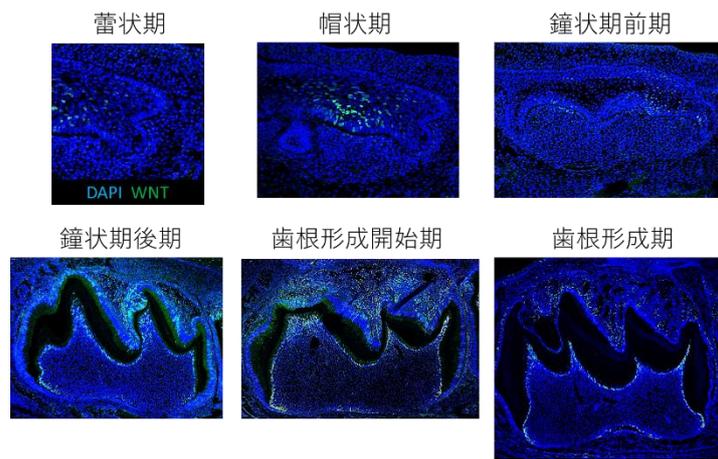


図4 臼歯の発生段階ごとのWntシグナル発現

これまでの研究結果より生後4日のマウスに CPA を投与すると帽状期である M3 が消失することが示されている。今回生後4日の R26-WntVis マウスに CPA を投与し、投与 1,2 日後において M3 の組織切片の TUNEL 染色を行った (図5)。実験群の M3 では、TUNEL

染色陽性細胞は増加して歯胚は縮小し、アポトーシスの増加によってM3の欠如が生じていると考えられた。実験群では、GFPが発現している細胞周囲にTUNEL染色陽性細胞が増加していた。これらの結果から、CPA投与直後にはWntシグナル周囲の細胞特異的にアポトーシスが生じることが示唆された。

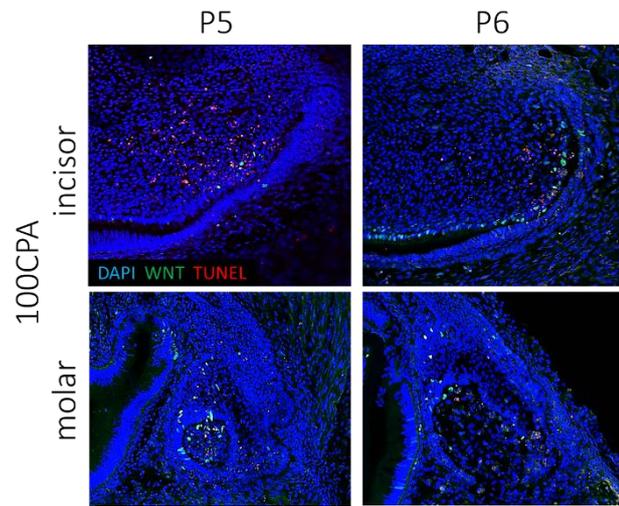


図5 CPA投与1,2日後のTUNEL染色、WNTシグナル発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0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 Aoyama Gozo, Kurosaka Hiroshi, Oka Ayaka, Nakatsugawa Kohei, Yamamoto Sayuri, Sarper Safiye Esra, Usami Yu, Toyosawa Satoru, Inubushi Toshihiro, Isogai Yukako, Yamashiro Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Observation of Dynamic Cellular Migration of the Medial Edge Epithelium of the Palatal Shelf in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	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) 10.3389/fphys.2019.00698	査読の有無 無
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 Nakatsugawa Kohei, Kurosaka Hiroshi, Inubushi Toshihiro, Aoyama Gozo, Isogai Yukako, Usami Yu, Toyosawa Satoru, Yamashiro Takashi	4. 巻 41
2. 論文標題 Stage- and tissue-specific effect of cyclophosphamide during tooth development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Orthodontics	6. 最初と最後の頁 519 ~ 530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ejo/cjz002	査読の有無 無
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 Oka Ayaka, Kurosaka Hiroshi, Nakatsugawa Kohei, Yamashiro Takashi	4. 巻 79
2. 論文標題 Surgical and orthodontic approach for a patient with a severely constricted maxillary arch caused by bilateral cleft lip and palate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Orthodontic Waves	6. 最初と最後の頁 127 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13440241.2020.1751456	査読の有無 無
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 Nakatsugawa Kohei, Kurosaka Hiroshi, Yamashiro Takashi	4. 巻 79
2. 論文標題 Orthognathic treatment of patient with missing permanent first molars	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Orthodontic Waves	6. 最初と最後の頁 135 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13440241.2020.1822062	査読の有無 無
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 Yamamoto Sayuri, Kurosaka Hiroshi, Miura Jiro, Aoyama Gozo, Sarper Safiye Esra, Oka Ayaka, Inubushi Toshihiro, Nakatsugawa Kohei, Usami Yu, Toyosawa Satoru, Yamashiro Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Observation of the Epithelial Cell Behavior in the Nasal Septum During Primary Palate Closure in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	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) 10.3389/fphys.2020.538835	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中津川 昂平, 黒坂 寛, 山城 隆
2. 発表標題 小児がん治療が顎顔面形態と永久歯歯胚形成に与える影響
3. 学会等名 日本矯正歯科学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------