

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17158

研究課題名（和文）環境要因と遺伝要因により部分無歯症に至るメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of oligodontia caused by environmental and genetic factors

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） 3,500,000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やバルプロ酸、レチノイン酸を投与することで、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、特に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。小児がん治療などの環境要因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い。本研究では、顎顔面領域での発生に重要とされているWntシグナルを蛍光タンパクで可視化するマウスを用い、小児がん治療薬、バルプロ酸とレチノイン酸をこのマウスに投与した。これにより環境要因がもたらす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、環境要因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 occurs depending on the dental stage. In this study, we focused on Wnt signaling, which plays an important role in tooth germ formation. We administered CPA, valproic acid, and retinoic acid to mice in which Wnt signals were visualized using fluorescent proteins, and examined their effects on the process of tooth development. 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.

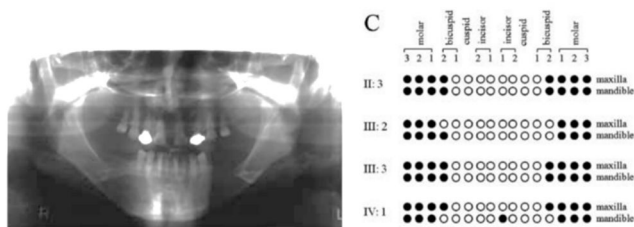
研究分野：矯正歯科学

キーワード：部分無歯症 Wnt10A 小児がん 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

家族性の部分無歯症では、遺伝子変異に起因して永久歯の先天欠如が生じることが知られている(図1)。その欠如部位は、家族同士で似通っているが、完全に一致しないことが多く(図1)、遺伝要因だけでなく環境要因が関わっている可能性が疑われる。



Suda N et al. J Dent Res 2010

図1 家族性の部分無歯症における異なった先天欠如部位

歯の正常な形態形成にはエナメルノットの存在が必要であり、このエナメルノットにおける細胞群ではカノニカル Wnt シグナルが活性化していることが知られている。そのため、環境要因や遺伝要因により歯胚形成時の Wnt シグナルへの影響が生じた場合には、歯の形成異常が生じると考えられ、環境要因と遺伝要因の相互作用によりさらに重篤な形成異常が生じることが考えられる。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。本研究では、Wnt シグナルに影響を与える環境要因として、シクロホスファミド (CPA)、バルプロ酸 (VPA)、レチノイン酸 (RA)を用いて歯胚の発生に重要とされているカノニカル Wnt シグナルを GFP で可視化するマウス (R26-WntVis マウス)に投与することで、環境要因が歯胚の Wnt シグナルに及ぼす影響が明らかになると考えられた。さらに遺伝的要因との相互関係を明らかにするため、WNT10A ノックアウトマウスにも CPA, VPA, RA を投与することで、環境要因と遺伝要因の相互作用が解明できると予想された。これらの事から、R26-WntVis mouse と Wnt10A のノックアウトマウスを用い、環境要因と遺伝要因が及ぼす歯胚発生における 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環境要因と遺伝要因による歯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、R26-WntVisマウスを用い、CPA、VPA、RAの投与を行うことで、環境要因による歯の発生過程への影響の探索を行う。さらには、WNT10Aのノックアウトマウスを作成して同様に3種の薬剤を投与し、薬剤投与による歯の形成異常において WNT10Aがどのように影響しているのかを解明する。

### 3. 研究の方法

【研究1】CPA、VPA、RA投与が及ぼす臼歯と切歯歯胚におけるWntシグナルへの影響を明らかにし、臼歯や切歯形成異常が生じる原因を解明する。

R26-WntVisレポーターマウスにCPA、VPA、RAのいずれかを投与し、投与後マウス切歯と臼歯歯胚の凍結切片を作成し、Wntシグナルを観察することでエナメルノットやWntシグナルの薬剤投与後の変化について解析する。また、細胞死や細胞増殖の解析をするために凍結切片の蛍光染色を行い、細胞動態の観察を行う。

【研究2】WNT10Aノックアウトマウスの歯の形成異常を明らかにする。

WNT10Aノックアウトマウスの一般的に第三臼歯が萌出する生後26日で上下顎骨のμCTを撮影し、3次元的な臼歯と切歯の形態を観察する。

【研究3】WNT10AノックアウトマウスへのCPA, VPA, RA投与が及ぼす臼歯と切歯歯胚におけるWntシグナルへの影響を明らかにし, 遺伝要因と環境要因が複合した場合の臼歯や切歯形成異常が生じる原因を解明する。

WNT10A ノックアウトマウスに CPA, VPA, RA のいずれかを投与し, 投与後マウス切歯と臼歯歯胚の凍結切片を作成し, カテニンの免疫染色を観察することで間接的に Wnt シグナルを観察し, エナメルノットや Wnt シグナルの薬剤投与後の変化について解析する。

#### 4. 研究成果

R26-WntVis レポーターマウスに CPA を投与し 投与後マウス切歯と臼歯歯胚の凍結切片を作成し Wnt シグナルを観察することでエナメルノットや Wnt シグナルの薬剤投与後の変化について解析した。また, 細胞死の解析をするために凍結切片の蛍光染色を行い, 細胞動態の観察を行った。まず胎生 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、

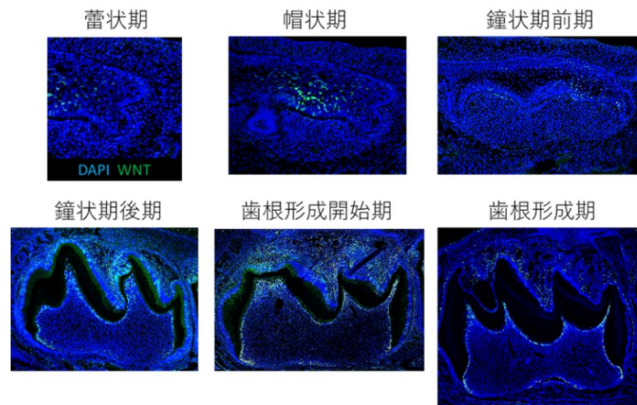


図2 臼歯の発生段階ごとのWntシグナル発現

、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2)。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。

我々の先行研究の結果より、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。そのため本研究では生後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 と切歯の組織切片の TUNEL 染色を行った(図3)。実験群の M3 と切歯のサービカルループ周囲では、TUNEL 染色陽性細胞は増加していた。M3 の歯胚は縮小し、アポトーシスの増加によって M3 の欠如が生じている

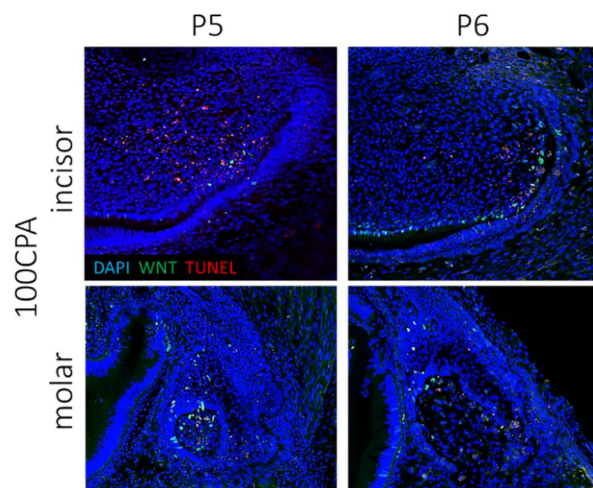


図3 CPA投与1,2日後のTUNEL染色、WNTシグナル発現

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 シグナルに隣接した細胞特異的にアポトーシスが生じることが示唆された。現在 R26-WntVis レポーターマウスに CPA に加えて VPA, RA を投与し、投与後のマウス切歯と臼歯歯胚の凍結切片を作成して Wnt シグナルの薬剤投与後の変化について解析している。また, 細胞死や細胞増殖の解析をするために凍結切片の蛍光染色を行い, 細胞動態の観察も行っているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
2. 発表標題 小児腫瘍治療経験者における顎顔面形態と永久歯の形成状態の特徴
3. 学会等名 近畿東海矯正歯科学会
4. 発表年 2021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
---------	---------