HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A systematic analysis for localization of predominant growth fac tors and their receptors involved in the murine tooth germ differentiation by use of in situ hybridization technique [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	久本, 芽璃
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11708号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58669
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Meri_Hisamoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　久　本　芽　璃

学　位　論　文　題　名

A systematic analysis for localization of predominant growth factors and their receptors involved in the murine tooth germ differentiation by use of in situ hybridization technique

(In situ hybridization 法によるマウス歯胚の分化に関連する成長因子と受容体の局在解析)

[緒言]

歯胚の分化は蕾状期、帽状期、鐘状期そして歯根形成期へと進む。その過程において歯胚の発生は、隣接した組織から分泌される様々な成長因子のクロストークにより巧妙に制御されている。近年、この分野の研究は著しく進歩し様々な成長因子が同定されているが、in vivo におけるシステマティックな解析は不十分である。歯胚の分化の全体像を理解する上で、関連する成長因子の発生段階に応じた局在と、因子同士の相互関係およびシグナル経路について明らかにする必要がある。本研究では in situ hybridization 法を用いて、胎子と新生子のマウスの歯胚における様々な成長因子と受容体の発現を調べた。

[材料と方法]

胎生 16.5 日と生後 1 日の ddY マウスの頭部を使用し、in situ hybridization 法により成長因子と受容体の発現を解析した。

［結果］

1. TGF-β

TGF-β の 3 つのサブタイプのうち、TGF-β1 と β2 の mRNA の発現が歯胚の発達過程において優勢であった。胎子における *TGF-β1* と *β2* は内/外エナメル上皮に発現し、特に *TGF-β2* のシグナルは歯根形成に関与するサービカルループに集中していた。胎子歯胚の *TGF-βR1* と *TGF-βR3* の発現はかなり弱かったが、*TGF-βR2* は歯乳頭に中程度に発現した。ゆえに、胎子の TGF-βs のシグナル経路は、オートクリン調節を考慮しなければエナメル上皮から歯乳頭へ向かう可能性が高い。

TGF-β と *TGF-βR* の発現の強さは新生子で増加した。胎子と違って新生子の *TGF-β1* の発現は、象牙芽細胞で最も強くエナメル芽細胞で弱かった。一方、*TGF-β2* は象牙芽細胞よりエナメル芽細胞に強く発現した。新生子の *TGF-βR1* と *TGF-βR2* のシグナルはエナメル芽細胞と象牙芽細胞の両方に存在したが、*TGF-βR2* はエナメル芽細胞での発現が強かった。したがって、より強く発現した因子に注目すると、TGF-β1 が新生子における重要なシグナルであり、象牙芽細胞から発せられたシグナルはエナメル芽細胞へ向かうのであろう。この方向性は *Smad3* が新生子のエナメル芽細胞に強い発現を示したことからも裏付けられる。

2. BMP

歯胚に発現する BMP のサブタイプとして BMP2-7 が報告されているが、特に BMP2 と BMP4 は上皮間葉相互作用に関連する重要な因子である。本研究では、胎子の *BMP2* は歯乳頭の下部と primary/secondary enamel knot に強く発現し、新生子では象牙芽細胞と歯髄全体に強く発現した。よって、BMP2 のシグナルは歯乳頭と象牙芽細胞から発せられていると言える。BMP2 とはやや異なり、胎子の *BMP4* は歯乳頭の上部と secondary enamel knot に特異的に発現していたが、新生子での発現はエナメル芽細胞に中程度に、象牙芽細胞で弱いものであった。

BMP の受容体のうち BMPR2 に注目すると、胎子での発現は歯胚全体に弱かったが、新生子ではエナメル芽細胞と象牙芽細胞に中程度の強さで発現した。さらに新生子のエナメル芽細胞は *Smad5* を強く発現していた。

3. FGF と PDGFA

FGF4 が咬頭の形成に関与する enamel knot の重要なシグナル因子であることは周知の事実であるが、本研究では FGF のうち FGF4 と FGF2 の発現を調べた。*FGF4* は胎子では primary enamel knot に限局して発現したが、新生子の歯胚には全く発現しなかった。したがって、FGF4 は発生の初期段階にのみ発現し、咬頭の形成に関与すると言える。一方で *FGF2* のシグナルは胎子、新生子ともに検出できなかった。

PDGFα は胎子の歯胚の内/外エナメル上皮とサービカルループに発現した。新生子ではエナメル芽細胞と enamel-free area に強く発現した。一方、*PDGFRα* は胎子の歯乳頭と中間層に、新生子では象牙芽細胞と中間層に発現した。それゆえに、PDGFα のシグナルは上皮から間葉へ向かうと考えられる。

4. 歯小嚢における成長因子

胎子と新生子の歯小嚢には、IGF-1R を除く IGF 関連分子が一貫して発現した。すなわち、*IGF-1*、*IGF-2*、そして *IGFBP3* が歯小嚢に強く発現した。胎子の *IGF-2* はこれとは別にエナメル器先端近くの星状網に強く発現し、内/外エナメル上皮と歯乳頭には弱い発現を示した。一方、新生子の *IGF-2* の発現は歯胚全体で弱かった。*IGF-1R* の発現は歯小嚢ではみられなかったが、胎子と新生子の両方で中間層に強く発現した。さらに、*IGFBP3* は歯小嚢の他に歯乳頭/歯髄の血管に特異的に発現した。

CTGF の発現は胎子では内外エナメル上皮と歯小嚢であったが、新生子になるとその発現部位は象牙芽細胞と歯小嚢へ移行した。

［考察］

上皮間葉相互作用に関連する重要な因子として TGF-β ファミリー（TGF-βs、BMPs）がある。本研究の所見から、胎子の TGF-βs のシグナルは内エナメル上皮から発して歯乳頭へ向かい、特に TGF-β2 は歯根形成に関わる重要な因子と言える。一方、新生子では *TGF-βs* と *TGF-βRs* は、象牙芽細胞とエナメル芽細胞の両方に発現した。それゆえに、オートクリン調節機能を有する TGF-β のシグナル経路の方向性を新生子において決定することは難しい。しかしながら、新生子における有力な因子である *TGF-β1* が象牙芽細胞に強く発現し、*TGF-βR2* と *Smad3* がエナメル芽細胞に発現したことから、TGF-β1 のシグナルは象牙芽細胞からエナメル芽細胞へ向かっている可能性がある。以上より、TGF-βs は胎子では象牙細胞の分化を誘導し、歯胚の成長が進むとエナメル芽細胞の分化にとって重要な因子となると言える。

TGF-β ファミリーのうち、BMP2 のシグナルは胎子では enamel knot から歯乳頭へ発せられ、新生子になると象牙芽細胞からエナメル芽細胞へ向かうと考えられる。一方、*BMP4* は胎子では *BMP2* とほぼ同様の発現を示したが、新生子になると *BMP2* とは異なり、エナメル芽細胞に中程度に発現した。さらに新生子の *Smad5* がエナメル芽細胞に発現したことから、新生子での BMP/Smad シグナルは間葉から発せられエナメル芽細胞の分化に影響を与えると言える。

PDGFA もまた上皮間葉相互作用の重要な因子である。本研究の結果から、エナメル上皮に存在する PDGFα のシグナルは、間葉とその後に続く象牙芽細胞の分化を誘導することが示唆された。

CTGF は胎子ではエナメル上皮に発現し、新生子では象牙芽細胞に発現したことから、発現部位が上皮から間葉へ移行するもう一つの例を示した。

歯小嚢には胎子では *IGF-1*、*IGF-2*、*IGFBP3* が発現し、新生子ではそれらに加え *CTGF*

と *PDGFα* が発現した。これらのシグナル因子は、歯根膜を含めた歯周支持組織の分化に関連する重要な因子と言える。また、*IGFBP3* は歯乳頭と歯髄に存在する血管にも強く発現した。IGFBP3 は血中から IGFs を標的組織へ輸送する機能を有することから、この結果は支持される。

胎子と新生子の *IGF-1R* は中間層に発現した。この部位の機能の全容は明らかではないが、IGF-1R を介したシグナルが、隣接するエナメル芽細胞の分化に影響を与えていることが示唆される。さらに、*PDGFRα* も中間層に発現した。よって PDGFα/PDGFRα は IGF-1/IGF-1R と同様の機能を有し、PDGFA と IGF-1 は協調して中間層の機能に影響を及ぼしている可能性がある。

本研究は咬頭の形成に関連する成長因子についても調べた。過去の報告同様に、*FGF4*、*BMP2*、*BMP4* が enamel knot に発現し、改めてこの部位の重要性を強調した。また、咬頭の形成に関連する別の成長因子として、*PDGFα* が enamel-free area に発現した。この部位はげっ歯類に特徴的で、歯が萌出するときに咬頭の一部でエナメル質が形成されない場所である。ここに凝集する小円形細胞の種類を今回は同定できなかったが、この部位の機能を明らかにするために更なる研究が必要である。

以上より、歯胚の発生には様々な成長因子が相互に絡み合って、複雑な歯牙の形態形成をしていくことが示唆された。