

研究者：木村 基善（所属：東京歯科大学小児歯科学講座）

研究題目：象牙芽細胞分化過程における Wnt シグナル経路と FGF8 の相互作用の検討

目的：

歯は歯原性上皮と間葉系組織の相互作用により構成され、帽状期移行する際に歯胚に形成されるエナメル結節が中心的な役割を果たしている。エナメル結節による成長因子の関与は分かっているものの分化過程における制御メカニズムは詳細には明らかにされていない。Wnt シグナル経路と FGF8 はそれぞれ歯の発生における重要なサイトカインとして機能することが報告されているが、これら因子が相互にどのように働いているかの検討は行われていない。本研究ではこれまでの知見をもとに、象牙質特異的タンパク質である *Dmp1* の発現と共に EGFP を発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを用いて間葉系細胞から象牙芽細胞への分化過程における Wnt シグナル経路と FGF8 の相互作用の検討とともに遺伝子発現解析により分化制御機構の一端を明らかにすることを目的とする。本研究は歯の発生メカニズム解明の一助となり、ヒトにおける歯の再生医療技術の進歩に貢献する学術的、臨床的に高い意味をもつ研究であると考ええる。

対象および方法：

cre-loxp system によって作製された *Dmp1-Cre-EGFP* マウスの歯原性間葉系組織を採取し、細胞培養を行う。FGF8 と古典的 Wnt シグナル経路を活性化させる GSK3 β inhibitor を用いて象牙芽細胞分化における相互作用の検討を行う。また培養した細胞にセルソーターを用いて EGFP の発現を指標として象牙芽細胞分画と非象牙芽細胞分画に分ける。その後両者の遺伝子発現を解析し、象牙芽細胞分画で発現が上昇している遺伝子を同定する。その後、前述のマウスから iPS 細胞を樹立し、神経堤から象牙芽細胞へと分化させる。セルソーターで分けた象牙芽細胞分画細胞群を歯原性上皮と組合せ再生歯胚を作成し歯の再生を目指し、ヒトにおける iPS 細胞由来の歯の再生の実現の可能性を目指す。

結果および考察：

作製したコンディショナルトランスジェニックマウスの歯の成長に伴う *Dmp1* の発現の変化の観察を行った。出生直後および出生二日後においては EGFP の発現が特に上皮において顕著に確認でき、4 日目を境に間葉系へその発現は移行し、その後その領域も徐々に増加している様子が認められた。成長とともに *Dmp1* が発現していくのが分かるとともに出生直後においては間葉系組織において *Dmp1* 陽性細胞はほとんど認められず分化前であることが確認できた（図 1）。

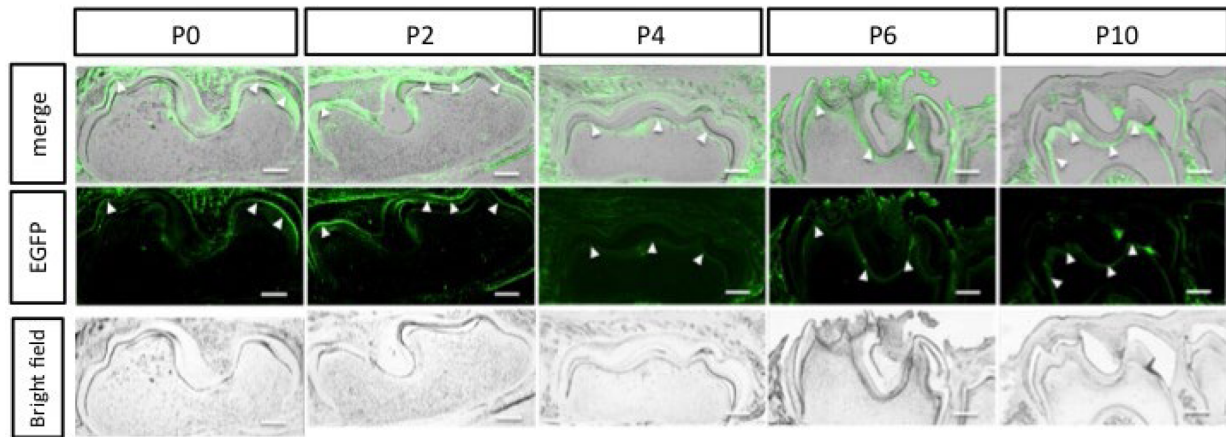


図1 出生直後は歯原性上皮において、出生後4日目からは間葉系組織において Dmp1-EGFP の発現が強く認められた

細胞培養においては CHIR99021 と FGF8 の同時投与群は単独投与群と比較して有意に細胞増殖を認めた。また細胞の形態も象牙芽細胞に特徴的な紡錘形を呈していた (図2)。

real time PCR の結果、同時投与群において象牙芽細胞分化マーカーである DMP1、DSPP、Nestin、Pannexin3 の発現は他の群と比較して有意に亢進が認められた (図3)。骨細胞分化マーカーとして用いられる Rankl や Runx2、Bglap、の発現は全てにおいて発現の低下が認められた。一方で OSX や BSP については有意な発現の亢進が認められ、歯原性細胞への分化に寄与したことを示唆する結果となった。

本研究により wnt / β -catenin シグナル伝達経路と FGF8 との相互作用が象牙芽細胞分化において相互に働く可能性を示した。しかし、分化は十分ではなくさらなる見当が必要である。今後はセルソーターを用いて EGFP の発現を指標として象牙芽細胞分画と非象牙芽細胞分画に分け、その後両者の遺伝子発現を解析し、象牙芽細胞分画で発現が上昇している遺伝子を解析する予定である。

また現在はセルソーターで分けた象牙芽細胞分画細胞群を胎生マウスから採取した歯原性上皮と組合せ再生歯胚を作製している。

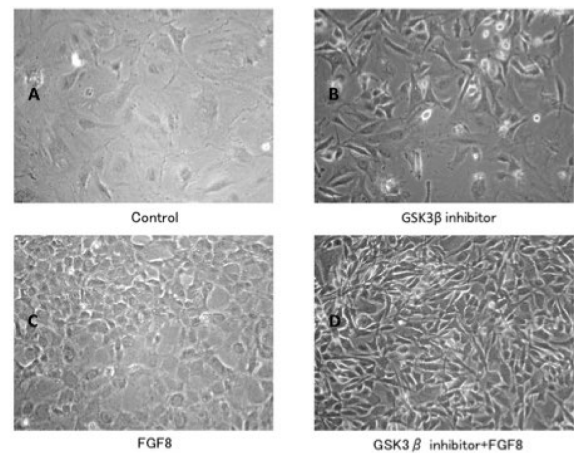


図2 GSK3 β inhibitor と FGF8 の同時投与は単独投与と比べて歯原性間葉系細胞の増殖させ、細胞形態に変化を与えた

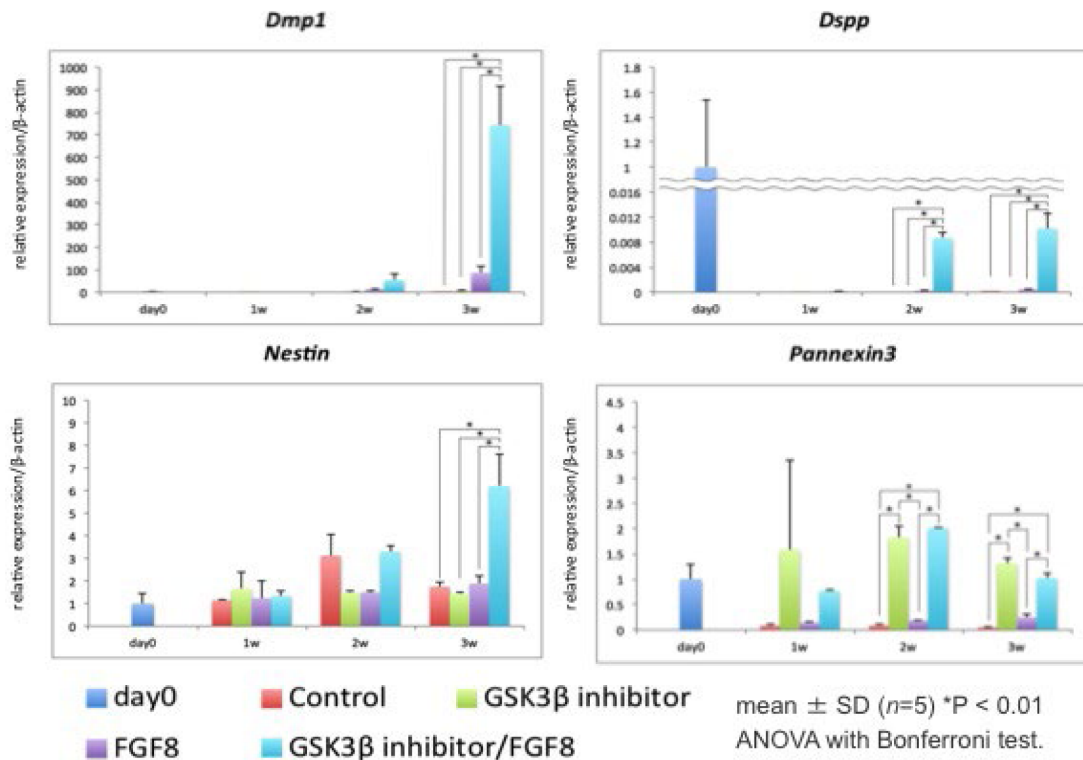


図3 GSK3 β inhibitor と FGF8 の同時投与は単独投与と比べ象牙芽細胞マーカーを顕著に増加させた

成果発表：

本研究の結果の一部は国際小児歯科学会（2019年7月3～6日）にて発表予定である。また今後も研究を続け、論文にする予定である。