

## 論文の内容の要旨

氏名：小川 奈保

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：*Fgf20* and *Fgf4* may contribute to tooth agenesis in epilepsy-like disorder mice.

（てんかんモデルマウスにおける先天欠如歯発症への *Fgf20* と *Fgf4* の関与の可能性）

歯の先天欠如はヒトの歯における最も一般的な発育異常の 1 つであり、永久歯の先天欠如の発症率は第三大臼歯が最も多く、人口の約 20%に認められる。第三大臼歯に続いて下顎第二小臼歯、上顎側切歯と上顎第二小臼歯の順で多くみられ、それらの頻度は 1.6%から 5.2%であると言われている。最近の遺伝子研究において *Msx1*、*Pax9*、*Axin2*、*Wnt10a*、*Spry2*、*Spry4*、*Eda* の突然変異が非症候群性の永久歯先天欠損症と関係していることが報告されているが、これらはいずれも第一大臼歯を含む多数歯先天欠如の原因として報告されている。しかし、日常臨床で頻繁に遭遇する第三大臼歯および前歯・小臼歯の欠如の原因はいまだに解明されていない。幼児期における歯の先天欠如は歯列不正、不正咬合を引き起こし、口腔機能の妨げとなるため、歯の先天欠如の原因を解明することは重要である。

ヒトにおいて歯の先天欠如の原因遺伝子を探求することは、対象となる家系の選定や試料採取の点から困難が多いため、ヒトとの遺伝的相補性の高いモデルマウスを用いることが有効である。Epilepsy-like disorder (EL) マウスはてんかんのモデルマウスであり、頭蓋顔面の外表奇形なしに高頻度で第三臼歯 (M3) が欠如している。そのため、ヒトの歯の先天欠如の原因究明に応用できる良いモデルである。そこで、本研究は EL マウスを用いて M3 欠如の原因遺伝子を特定することを目的に行った。

まず EL マウスと対照である C57BL/6 マウスの M3 欠如頻度の評価および組織学的検討を行った。頭部の切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、生後 3、4、5 日齢の M3 歯胚を実体顕微鏡下にて観察した。次に遺伝子発現解析を行った。EL マウスの M3 歯胚の発達は蕾状期に停止していたため、M3 が蕾状期にある生後 3 日齢の EL マウスと C57BL/6 マウス各 10 頭の頭部凍結切片より、上下顎 M3 歯胚を歯小嚢を含めて実体顕微鏡下にてマイクロダイセクト・回収し、total RNA を抽出した。抽出した total RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析にて網羅的遺伝子発現解析を行った。DNA マイクロアレイ解析の結果から NCBI データベース上で歯の発生に関連した 137 の遺伝子を選定し、C57BL/6 マウスよりも EL マウスの方が発現比率が 2 倍以上低い値の遺伝子を抽出したところ、*Fgf20* と *Fgf4* に興味のある結果が得られた。更に、過去の文献より *Eda* は歯の形成初期に *Fgf20* と *Fgf4* の発現を調節していると報告されているため、*Fgf20*、*Fgf4*、*Eda* のプライマーを設計し、RT-PCR およびリアルタイム PCR を行った。また *In Situ* ハイブリダイゼーションにより *Fgf20* と *Fgf4* の mRNA の局在の確認を行った。続いて遺伝子変異解析を行った。*Fgf20*、*Fgf4*、*Eda* のエクソン内に変異があるかどうかを分析するために EL マウスと C57BL/6 マウスの DNA を PCR 増幅し、シーケンス解析を行い、Ensembl データベースの DNA 配列と比較した。

本研究により以下の結果を得た。

- 1) M3 欠如頻度は EL マウスでは上下顎左右側とも 100%欠如していたが、C57BL/6 マウスでは欠如は観察されなかった。
- 2) 生後 3、4、5 日齢の M3 の HE 染色切片観察の結果、EL マウスの M3 歯胚は蕾状期で停止していた。一方 C57BL/6 マウスの歯胚は蕾状期を経て帽状期まで発達していた。
- 3) DNA マイクロアレイ解析の結果、EL マウスの 蕾状期 M3 歯胚における発現比率は log2 比率で *Fgf20* は -3.01、*Fgf4* は -2.27 に減少していた。一方、*Eda* では増加していた (log2 比率 : 0.29)。ヒト部分性無歯症関連の遺伝子 (*Msx1*、*Pax9*、*Axin2*、*Spry2*、*Spry4*、*Wnt10a*) では 2 倍以上の差はみられなかった。
- 4) C57BL/6 マウスに比較した EL マウスの M3 の *Fgf20* と *Fgf4* の発現低下は RT-PCR によって確認され、リアルタイム PCR 法による定量の結果、mRNA 発現の低下について統計学的に有意差が認められた。一方、C57BL/6 マウスに比較した EL マウスの M3 の *Eda* の発現増加は RT-PCR によって確認され、リアルタイム PCR 法による定量の結果、mRNA 発現の増加について統計学的に有意差が認められた。
- 5) *In Situ* ハイブリダイゼーションでは、*Fgf20* と *Fgf4* の mRNA 発現は C57BL/6 マウスの蕾状期の M3 歯胚上皮先端部で強く観察された。一方、EL マウスの蕾状期 M3 歯胚ではほとんど観察されなかった。

6) 遺伝子変異解析では、EL マウスの *Fgf4* の Exon2 において、アミノ酸配列に変化のない1つのサイレント変異を検出した。また EL マウスの *Fgf20* の Exon1 において、アミノ酸配列が置換する1つの非同義変異を検出したが、データベース上に既に多型として同定されていた。一方、*Eda* の Exon では変異は認められなかった。

以上の結果から、EL マウスの蓄状期 M3 歯胚における *Fgf20* と *Fgf4* の mRNA 発現の減少が EL マウスの M3 の先天欠如に関与する可能性が示唆された。また *Eda* 過剰発現下の *Fgf20* の mRNA 発現の減少が EL マウスの M3 の先天欠如に関連する可能性が示唆された。本研究結果はヒトにおける歯の先天欠如の原因解明の一助になるものと考えられた。