

## 論文審査の結果の要旨

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）

審査委員：（主査） 日本大学教授 歯学博士 近藤 信太郎

（副査） 日本大学教授 博士（歯学） 平塚 浩一

（副査） 日本大学教授 博士（歯学） 清水 武彦

先天欠如歯は口腔の発育異常で最も一般的なものの一つである。先天欠如歯は、1歯から数歯の比較的少数歯に限られるものから、多数歯に及ぶものまで様々で、ごく稀に全歯が先天欠如する場合もある。永久歯の先天欠如の発症率は第三大白歯が最も多く、人口の約20%に認められる。第三大白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* のエクソン内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白歯および前歯・小臼歯の欠如の原因はいまだに解明されておらず、他の遺伝子が関係しているであろうと考えられている。特に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として確立されているが、頭蓋顔面の外表奇形なしにほぼ100%の頻度で第三臼歯 (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、本論文の著者は EL マウスを用いて M3 欠如の責任遺伝子を探索することを目的に研究を行った。

まず EL マウスと対照である C57BL/6 マウスの M3 欠如頻度の再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。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。続いて 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、9つの遺伝子が抽出され、特に *Fgf20* と *Fgf4* の発現が著明に減少していた。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 qRT-PCR を行った。また *In Situ* ハイブリダイゼーションにより M3 歯胚での *Fgf20* と *Fgf4* の mRNA の局在の確認を行った。更に *Fgf20*、*Fgf4*、*Eda* のエクソン内の遺伝子変異解析のため EL マウスと C57BL/6 マウスのエクソン領域を PCR 増幅し、シーケンス解析を行い、両者を比較した。

本研究により以下のような結果を得ている。

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*Fgf20*は8.06倍、*Fgf4*は4.86倍減少していた。一方、*Eda*では増加していた(log<sub>2</sub>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) RT-PCRおよびqRT-PCR法により、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、*Eda*の発現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。またHE染色にて、C57BL/6マウスの*Fgf20*と*Fgf4*のmRNAの強発現が観察された歯胚上皮先端において細胞集積によるエナメルノットが観察された。一方、ELマウスでは観察できなかった。

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。

以上の結果から本論文の著者は、ELマウスを用いてM3欠如の責任遺伝子を解明することを目的に検討を行った結果、ELマウスの蕾状期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を示唆した。またELのM3での*Eda*のmRNA発現上昇は、M3発生に対して抑制的に働いている可能性を示唆した。

以上のことから、ELマウスの第三臼歯欠如に、蕾状期の*Fgf20*と*Fgf4*のmRNA発現減少が関与する可能性が明らかとなった。本研究は動物モデルを用い先天欠如歯の原因について新たな知見を得たものであり、歯科医学ならびに小児歯科臨床の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文の著者は、博士(歯学)の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

平成28年1月28日