

論 文 内 容 要 旨

題 目

Expression of *fibroblast growth factor receptor1*, *-2c*, and *-3c* transcripts in mouse molars after tooth eruption

(マウス臼歯萌出後における線維芽細胞受容体 (*Fgfr*) *1*, *-2c*, *-3c* 転写産物の発現)

著 者

神尾 強司

内容要旨

象牙芽細胞は各ステージにおいて一次、二次、三次(反応性)象牙質を形成する。萌出後の象牙芽細胞は基質形成が活発ではないが、三次象牙質の形成などにより、象牙細管や歯髄の恒常性の維持に関与している。このような観点から、萌出後の象牙芽細胞を制御する因子を明らかにすることは、歯髄生物学への新たな洞察を開き、さらなる歯内療法の開発のために有益であると考えられる。FGF は歯の発生段階で働くことがこれまでに報告されており、その受容体 (FGFR) もそれに伴って、その発現パターンは歯の発生時期によって変動するが、歯冠形成期における象牙質形成に FGF-FGFR シグナルが関与していることを示唆するものである一方、現在のところ、歯根形成期以降の FGF シグナル伝達と象牙質形成関連因子に関する報告はない。

本研究では、二次・三次象牙質を含む歯の萌出後の象牙質形成に関わる FGF シグナルの関与を調べるために、2、4、8、12、16、20 週齢の ICR マウスを用いて、上顎第一臼歯における *Fgfr1*、*-2c*、*-3c* 転写産物の経時的発現パターンと発現細胞について解析した。同時に、高度に石灰化した歯牙組織から RNA を回収する方法についても検討した。

すべての実験動物は 4%パラホルムアルデヒド (0.1 M リン酸緩衝液、pH7.4) で灌流固定し、組織を採取した後、同じ固定液を用いて 4°C で 1 日固定した。その後、8%EDTA (pH 7.4) 溶液中に試料を浸漬し、4°C で 1~3 週間脱灰した。1 週間脱灰した組織を Quantitative real-time PCR (qPCR) に、2~3 週間脱灰した組織を組織観察と *in situ* hybridization (ISH) に使用した。固定と脱灰処置を受けた試料は Proteinase K (5.0 μ g/ml) を混合したホモジナイズバッファーを用いて、45°C で 70 分間処理した後、さらに 70°C で 20 分間熱処理を加えてからホモジナイズした。これらの処置は、固定によって RNA 鎖の塩基に結合するモノメチロール基を乖離させ、PCR 増幅の効率を向上させる効果がある。また脱灰液に EDTA を選択することで qPCR の C_q 値の増加を防いだ。cDNA 合成時の逆転写には、安定した転写のための短いアンプリコンを生成できるように、標的遺伝子のリバープライマーを用いて行った。

RNA 回収方法の妥当性は β -*actin* 転写産物を内在性コントロール因子として用いた qPCR で確認した。2 週齢のマウス下顎第一臼歯 (M₁) を対象に固定と脱灰の影響について C_q 値で比較すると、固定により C_q 値は約 2 サイクル程度高くなり、脱灰によっても C_q 値がわずかに影響を受

けることが明らかになった。一方、2、4、8、12、16、20 週齢間で比較すると Cq 値は安定して一定の値を示していた。よって、固定と脱灰を行った試料でも qPCR で安定して評価できると結論づけた。

マウス上顎第一臼歯 (M_1) に対して行った qPCR の結果、分化した象牙芽細胞のマーカーである *Dentin sialophosphoprotein* (*Dspp*) および *Fgfr2c* 転写産物の発現量が最も高い時期は生後 2 週齢であり、4 週齢以降は発現量が低下することが示された。一方、*Fgfr1* と *Fgfr3c* 転写産物の発現量は実験期間中一定であった。ISH の結果では、2 週齢と 4 週齢の象牙芽細胞に *Dspp*、*Fgfr1*、*Fgfr3c* 転写産物が検出された。また、8 週齢の反応性象牙質に面した象牙芽細胞に *Dspp* と *Fgfr1* の転写産物が検出された。

今回の研究において、歯の固定・脱灰後の石灰化組織から RNA を抽出する方法を改良することで、検出量は下がるものの安定した PCR の結果を得ることができた。また、FGF-FGFR シグナル伝達が、二次象牙質形成や三次象牙質形成を含めた萌出後の象牙芽細胞の制御に関与している可能性が示唆された。