

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 山田 茜  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第 475 号  
学位授与の日付 令和 3 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 Overactivation of the NF- $\kappa$ B pathway impairs molar enamel formation  
(NF- $\kappa$ B 経路の過剰が臼歯エナメル質形成に異常をもたらす)  
論文審査委員 主査 教授 大峽 淳  
副査 教授 高木 律男  
副査 教授 泉 健次

### 博士論文の要旨

#### [背景および目的]

外胚葉異形成症は毛髪、皮膚、腺、歯といった外胚葉器官の形成不全を特徴とする遺伝性疾患であり、150 以上の病型を含む。低汗型外胚葉異形成症 (HED) は外胚葉異形成症の中で最も頻度の高い疾患であり、HED 患者の歯の異常として、歯数の減少や咬頭数の減少、歯の劣成長、タウロドント、エナメル質形成不全などが報告されている。原因遺伝子として、TNF スーパーファミリーメンバーである EDA、EDAR、EDARADD が同定されている。EDA の変異は X 連鎖劣性遺伝性の HED を、EDAR の変異は常染色体劣性型の HED を、EDARADD の変異は常染色体優性遺伝型の HED を誘発する。EDA はリガンドであり、レセプターである EDAR に結合し、EDARADD は EDAR のアダプター分子として機能する。この EDA、EDAR、EDARADD は 1 つの経路として外胚葉器官の形成に関わる。EDA/EDAR/EDARADD 経路は、NF- $\kappa$ B 経路を活性化することが報告されている。NF- $\kappa$ B 経路は古典的経路、非古典的経路あるいはそのハイブリッド経路のいずれかにより活性化し、免疫、炎症反応、癌などの様々な生物学的現象に関与しているが、エナメル形成における NF- $\kappa$ B 経路の役割は明らかではない。そこで、NF- $\kappa$ B 経路のエナメル形成への影響を検索した。

#### [試料および方法]

keratin 5 (K5) プロモーターを用い、上皮細胞において NF- $\kappa$ B 古典的経路が過剰活性化するマウス (K5-I $\kappa$ k $\beta$ ) と NF- $\kappa$ B 非古典的経路が過剰活性化するマウス (K5-I $\kappa$ k $\alpha$ ) を作成し、歯の形態やエナメル形成への影響を検索した。成獣マウスの臼歯を、SEM、 $\mu$ CT で検索した。また、NF- $\kappa$ B 経路の活性は、GFP による NF- $\kappa$ B レポーターマウスである k-EGFP マウスの使用や、NF- $\kappa$ B 経路関連分子の発現により確認した。胎生 13、14 日、生後 3 日目、10 日目における変化を、H&E 染色、免疫染色、*in situ* hybridization、qPCR で解析した。

## [結果]

### 臼歯の咬頭形成

正常マウスの胎生 10.5 日から NF- $\kappa$ B 経路は歯胚上皮で活性化されることが報告されている。K5 も初期歯胚上皮での発現が確認され、K5-Ikk $\beta$  マウスの初期歯胚においても NF- $\kappa$ B 経路が過剰発現している可能性が示された。そこで、NF- $\kappa$ B の活性を k-EGFP マウスを用い観察したところ、正常マウスではエナメルノットに局在して NF- $\kappa$ B 経路が活性するのに対し、K5-Ikk $\beta$  マウスでは歯胚上皮全体に活性化していた。エナメルノットは咬頭形成に関わることが知られている。NF- $\kappa$ B 経路の減少は、咬頭の数の減少や劣成長を引き起こすことが報告されている。NF- $\kappa$ B 経路の増加が咬頭形成にいかなる影響を与えるかを検索するために、萌出直後の歯を観察した所、K5-Ikka マウス、K5-Ikk $\beta$  マウス共に、咬頭の増加が確認された。

### エナメル質形成

K5 は、エナメル芽細胞にも発現することを確認した。そこで、K5-Ikk $\beta$  マウスのエナメル芽細胞における NF- $\kappa$ B 経路の活性を確認した所、正常マウスに比べ、K5-Ikk $\beta$  マウスのエナメル芽細胞で NF- $\kappa$ B 経路活性が著しく上昇しているのが確認された。しかし、萌出直後の K5-Ikka マウスや K5-Ikk $\beta$  マウスの臼歯に、咬耗等は認められなかった。生後 6 ヶ月になると、K5-Ikk $\beta$  マウスの臼歯に、正常マウスや K5-Ikka マウスの臼歯には認められない著しい咬耗が認められた。 $\mu$ CT で解析したところ、K5-Ikk $\beta$  マウスの臼歯に、エナメル質の低石灰化が認められた。SEM による解析では、K5-Ikk $\beta$  マウスのエナメル質の厚みやエナメル小柱の配列に異常は観察されなかった。一方 Backscatter SEM により、エナメル小柱間の石灰化度が低くなっていることが確認された。エナメル質の形成は、エナメルタンパクが分泌される分泌期、それら分泌されたエナメルタンパクがタンパク分解酵素により脱却され、結晶が形成される成熟期に大別される。エナメル質の厚みやエナメル小柱の配列の結果は、K5-Ikk $\beta$  マウスの分泌期に異常がない可能性を示しており、事実、K5-Ikk $\beta$  マウスの分泌期のエナメル芽細胞の形態、Amelogenin などのエナメルタンパク量に著しい変化は観察されなかった。続いて、成熟期について検索を行った。成熟期のエナメル芽細胞の形態変化、エナメルタンパクの著しい残存等は、確認されなかった。一方で、成熟期の代表的なタンパク分解酵素である KLK4 の発現量を確認した所、K5-Ikk $\beta$  マウスで KLK4 が優位に増加していた。KLK4 の主な基質は Amelogenin である。そこで、著しく上昇した KLK4 の Amelogenin への影響を確認するために、Amelogenin の免疫染色を行ったところ、KLK4 の増加に伴って、Amelogenin のタンパク量が著しく消失していた。

## [考察]

K5-Ikk $\beta$  マウス、K5-Ikka マウスで過剰な咬頭が認められたことは、NF- $\kappa$ B 経路は古典的経路、非古典的経路のいずれの経路も咬頭形成に関与していることが示唆された。過去に、KLK4 の上昇がエナメル質形成異常に関与することが報告されている。K5-Ikk $\beta$  マウスでは、NF- $\kappa$ B 古典的経路の過剰活性によりタンパク分解酵素の過剰発現が誘導され、それによってエナメルタンパク質の急激な脱却とその後のエナメル質の石灰化不全が引き起こったと考えられる。ヒトの外胚葉異形成症におけるエナメル形成不全も、成熟期の酵素発現の異常による可能性が示された。また、非古典的経路の NF- $\kappa$ B 経路はエナメル形成に関与しないことが明らかとなった。

## [結論]

NF- $\kappa$ B シグナルは、古典的経路による成熟期のエナメルタンパク脱却酵素の発現制御を通して、正常エナメル形成に関与している可能性が示唆された。

## 審査結果の要旨

外胚葉異形成症は、歯科領域でもっとも多く治療対象となる先天性疾患の一つであり、その発症機序の解明には大きな意義がある。外胚葉異形成症には、歯の咬頭異常とエナメル形成不全が認められるが、本研究が明らかにした咬頭形成が古典的及び非古典的経路の両方の NF- $\kappa$ B 経路によって制御されている一方、エナメル形成は古典的経路の NF- $\kappa$ B 経路のみが関与するという知見は、外胚葉異形成症で症状のある他の部位への理解にもつながる大きな意味を持つ。さらに、本研究は単に器官発生研究に留まらず、NF- $\kappa$ B シグナルの研究にも貢献できる。NF- $\kappa$ B シグナルの活性を、レポーターマウスの解析だけでなく、関連分子の *in situ hybridization* や免疫染色など多面的に確認したことは、本研究の科学性の高さを示している。本研究は、6ヶ月齢における臼歯の咬耗を見出し、その原因を追求したものである。通常、エナメル形成に関する研究は、2～3ヶ月齢のマウスを使用し、2～3ヶ月齢の時点で異常が認められないマウスの咬耗を発見した論文は例がない。本研究が遂行したように、2～3ヶ月齢の時点で異常の認められないマウスにおいても、咬耗の継続的な観察が必要である事を、本研究は示している。このような生後6ヶ月付近で咬耗が現れる微弱なエナメル形成不全を見逃さなかった点は、特筆すべきことと考える。更に、臨床で認められる著しい咬耗も微弱なエナメル形成不全を原因とする可能性を本研究は示唆している。また、通常の SEM 解析でエナメル小柱の配列に異常がない事を確認した上で、Backscatter SEM による解析を行い、小柱間の石灰化不全を発見した手法も本研究の科学レベルの高さを示すものとして特筆すべきものである。本研究結果は、成熟期における異常が原因である事を示しているが、組織学的な成熟期でのエナメルタンパクに著しい異常は確認されなかった。一方、Klk4 の過剰発現とその基質である Amelogenin の減少を認めている。このことは、一般的に用いられている組織学的なエナメルタンパクの確認ということが、必ずしも成熟期での機能の指標にならないことを意味し非常に興味深い。本研究成果は、NF- $\kappa$ B 経路が、咬頭の数決定するという歯の発生初期と、エナメル形成の成熟期という歯の発生後期に、別の機構により関わることを示しており、極めて有用な知見といえる。免疫染色の結果を数値化している点は、データの信頼性を高める上で非常に重要なポイントと考えられる。また、本研究は、Eda や Edar の欠損マウスや、それらの分子の過剰発現マウスで解決できなかった、Eda/Edar/Edaradd のエナメル形成における機能を、その下流の NF- $\kappa$ B の過剰活性で解明したものであり、外胚葉異形成症におけるエナメル形成不全を理解する上で、大きな糸口を見出した貴重なデータである。本研究結果は、外胚葉異形成症の症状が認められる皮膚科など他の領域への影響を与えるものと考えられ、本研究の影響力の広さを示している。

本研究によって得られたエナメル形成における NF- $\kappa$ B の機能解析は、エナメル発生研究にとっても、外胚葉異形成症を含めた先天異常の発症メカニズムの理解にとっても、非常に意義のある研究といえ、学位論文としての十分な価値が認められる。