

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 工藤 武久
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 486 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 **Ift88 regulates enamel formation via controlling Shh signaling**
(Ift88 は Shh のシグナル制御を介してエナメル形成を調節する)

論文審査委員 主査 教授 大峽 淳
副査 教授 齋藤 功
副査 教授 前田 健康

博士論文の要旨

[背景および目的]

一次繊毛は、長年、進化の過程で機能を失った細胞小器官と考えられてきたが、近年の分子生物学の手法の発展により、シグナル伝達の調整など様々な機能を有することが報告されてきている。一次繊毛の機能不全は、繊毛病と称される様々な先天性疾患を生じることも明らかになってきた。その繊毛病では、エナメル形成不全がしばしば認められる。しかし、一次繊毛のエナメル形成における役割は明らかではない。一次繊毛を構成するタンパクの一つに Ift88 がある。Ift88 の欠損は一次繊毛の欠損を引き起こすため、Ift88 は一次繊毛に必須のタンパクとして知られている。そこで我々は、この Ift88 の欠損マウスを用いて、一次繊毛のエナメル形成における役割を検索した。

[試料および方法]

Cre-LoxP システムを利用して、Keratin 14 (K14) Cre による Ift88 の上皮特異的欠損マウス (*Ift88^{fl/fl};K14Cre*) を作成し、エナメル質を検索した。SEM、 μ CT により臼歯を検索した。分子レベルでの変化を、免疫染色、*in situ* hybridization、qPCR により解析した。

[結果]

2ヶ月齢の *Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第二大臼歯、第三大臼歯に著しい咬耗が認められた一方、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第一大臼歯に著しい咬耗は認められなかった。4ヶ月齢の *Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第一大臼歯に僅かな咬耗が認められた。6ヶ月齢の *Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスでは、全ての臼歯に著しい咬耗が認められた。6ヶ月齢の Wild-type マウスの大臼歯には、僅かな咬耗しか観察されなかった。第二大臼歯のエナメル小柱の配列に著しい乱れが認められた。*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第一大臼歯のエナメル小柱の配列にも同様の乱れは認められたが、第二大臼歯に比べると軽度なものであった。エナメル小柱の配列の乱れから、分泌期のエナメル形成に異常があったと考えられ、分泌期におけるエナメル形成

を検索した。分泌期に発現する amelogenin、ameloblastin、enamelin、Mmp20 などのエナメル関連分子の発現は、第一大臼歯、第二大臼歯ともに *Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの歯胚で、wild-type マウスに比べ有意に減少していた。エナメル形成や一次繊毛との関連が報告されている Shh シグナルの活性を示す *Gli1* は、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第一大臼歯、第二大臼歯ともに、wild-type マウスに比べ有意に上昇していた。*Gli1* の上昇は、中間層と星状網で認められ、エナメル芽細胞における *Gli1* の発現は *Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウス、wild-type マウス共に観察されなかった。Shh シグナルの抑制物質である *Ptch1* は、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第一大臼歯、第二大臼歯ともに wild-type マウスに比べ有意に減少していた。*Gli2* は、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第二大臼歯において、wild-type マウスに比べ有意に上昇していたのに対し、第一大臼歯では有意に減少していた。*Gli3* は、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第二大臼歯では変化は認められなかったのに対し、第一大臼歯では wild-type マウスに比べ有意に減少していた。Wild-type マウスの第一大臼歯の歯胚上皮と第二大臼歯の歯胚上皮間での *Ift88* の発現量に大きな差は認められなかった。

[考察]

Ift88^{fl/fl};K14Cre マウスの早期の咬耗は、エナメル小柱の配列の異常、エナメル関連タンパク質の減少などから、エナメル形成不全によるものであることが示された。Shh シグナルは中間層で活性化され、隣接するエナメル芽細胞の分化を担うことが報告されている。本研究結果でも、中間層で Shh シグナルの上昇が認められた。この過剰な Shh シグナルにより中間層細胞によるエナメル芽細胞の分化が障害されたと考えられる。一方、*Ift88* 欠損によるエナメル形成不全は第二大臼歯でより重度であった。Shh シグナルの活性の上昇が、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第二大臼歯で wild-type マウスの 7 倍であったのに対し、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第一大臼歯では 1.5 倍程度であった。第二大臼歯でよりエナメル形成不全がより重度であったのは、これら Shh シグナルの上昇量の違いによるものであると考えられる。*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第一大臼歯、第二大臼歯共に、抑制物質である *Ptch1* の減少によって Shh シグナルは、上昇したと考えられる。*Gli2* と *Gli3* も Shh シグナル活性に関与するが、*Gli2* と *Gli3* は活性型と抑制型のいずれかに変化する。歯の発生においては、*Gli2* は活性型で、*Gli3* は抑制型として機能すると考えられている。表現型の強い *Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第二大臼歯では、*Gli2* が著しい上昇を示し、*Gli3* の発現量に変化は認められなかった。このため、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第二大臼歯における Shh シグナル活性は、抑制物質である *Ptch1* の減少と、活性機能を有する *Gli2* の上昇という相乗的な効果によって著しく上昇したと考えられる。それに対し表現型のマイルドな *Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの第一大臼歯では、抑制物質である *Ptch1* の減少と抑制型の *Gli3* の減少によって Shh シグナルの上昇が誘導される一方、活性型の *Gli2* の減少による Shh シグナルの減少も同時に引き起こることで、相対的に Shh シグナルの上昇量が、第二大臼歯に比べ弱くなり、エナメル形成不全もマイルドなものになったと考えられる。

[結論]

Ift88 は、Shh シグナルの活性をコントロールすることで、分泌期のエナメル関連タンパクの発現の制御を通して、正常エナメル形成に関与している可能性が示唆された。また、*Ift88* の機能は歯種により若干異なることが示された。

審査結果の要旨

近年、一次繊毛は様々な生物現象に関わることが明らかにされてきている。さらに、その機能不全

は様々な疾患を引き起こすため、一次繊毛の機能解明は非常に注目されている。本研究が明らかにしたエナメルにおける一次繊毛の機能は、生物学的にも、臨床的にも非常に大きな意義がある。小柱の変化から原因となる時期を特定したことは、非常に有用な切り口と感じた。エナメル形成のメカニズムは、どの歯種も同じと考えられてきた中で、Ift88 の関連する分子機構は、歯種間で異なることを示した点は、非常に重なる知見といえる。エナメルはエナメル芽細胞により形成されるため、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスにおけるエナメル形成不全の原因はエナメル芽細胞の異常にあることは確実であるが、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスでは、その直接的な原因がエナメル芽細胞そのものに生じた異常ではなく、隣接する中間層で Shh シグナルが過剰になったことであることを示した点は、特筆すべきことと考える。*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの臼歯で Shh シグナルが上昇したという結果は、通常では一次繊毛が Shh シグナルを抑制的に制御しているということを意味し非常に興味深い。一方、Shh シグナルの欠損もエナメル形成不全を引き起こすことから、エナメル形成において、Shh シグナル活性は特定の範囲内に誘導されることが求められる (fine tuning) という点も重要な概念と感じる。また、qPCR の解析だけでなく、in situ hybridization により、Gli1 の活性の上昇部位を特定している点は、Ift88 のエナメル形成における機能の部位を同定する意味で大きな点と言える。*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの臼歯での Shh シグナルの上昇が、Gli2 や Gli3 の変化によって引き起こること、それが第一大臼歯と第二大臼歯で異なることを示しており、これは一次繊毛に複数の Shh シグナル制御機能が存在することを示しており、一次繊毛の機能を知る上で極めて重要な知見と言える。さらに、それらの発見は、本研究が単にエナメル発生研究に留まらず、シグナル研究にも貢献できることを意味している。また第一大臼歯と第二大臼歯で *Ift88* の発現量に差がなかったということも、第一大臼歯と第二大臼歯の分子制御機構の違いを知る上で非常に貴重なデータである。また、*Ift88^{fl/fl};K14Cre* マウスの臼歯でエナメル関連タンパクの減少を、Shh シグナルの欠損ではなく、Shh シグナルの過剰に起因すると考察した点は、他のエナメル形成不全症の発症機序を考える上でも重要な概念と考える。Shh シグナルだけでなく、他のシグナル活性の変化も調べたことは、本研究の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。本研究結果は、繊毛病のエナメル形成不全だけでなく、繊毛病患者に認められる他の症状や、繊毛病そのものの理解に貢献でき、本研究の影響力の広さを示している。600 を超えるタンパクにより構成される一次線毛の詳細を理解するのに必須のデータと言える。

本研究によって得られたエナメル形成における *Ift88* の機能解析は、エナメル発生研究にとっても、繊毛病を含めたエナメル形成不全発症メカニズムの理解にとっても、繊毛病そのものの理解にとっても、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。