The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	シクロホスファミド投与が歯胚形成に与える影響
Author(s)	中津川, 昂平
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72255
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　中津川　昂平　　）	
論文題名	シクロホスファミド投与が歯胚形成に与える影響

【目的】

欠如歯，矮小歯や歯根形成不全を始めとする歯の形成不全は不正咬合の原因となり，多くが歯科矯正治療の対象となる。このような歯の形成不全は歯胚発生時における遺伝的なエラーや異常な外的環境により引き起こされる。中でも抗がん治療を行った既往のある小児には欠如歯や矮小歯，短根といった形成異常が報告されており，歯の形成異常に伴う生活の質の低下が問題となっている。臨床研究においては，若年者(5歳以下)への抗がん剤投与や高濃度での抗がん剤投与が歯の形成異常のリスクファクターであることが示されている。動物実験では，小児がんの代表的な治療薬であるアルキル化剤のシクロホスファミド（CPA）を用いた報告があり，CPAにより短根や矮小歯が生じ，投与濃度の増加に応じて短根が重症化することが明らかとなっている。しかし，抗がん剤の投与時期や投与濃度が歯胚形成に与える形態学的・組織学的変化や細胞動態への影響については不明な点も多く存在する。

本研究では，アルキル化剤のシクロホスファミド（CPA）を用い，抗がん剤の投与時期や投与濃度が歯胚形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

① 実験動物：実験には生後1－10日（P1-P10）のC57BL/6マウスを使用した。また，P1-P10の上皮差細胞で特異的に発現している Keratin 14(K14)プロモーター依存的に蛍光タンパクのGreen Fluorescent Protein（以下GFP)を発現するトランスジェニックマウス（K14-GFPマウス）を使用した。

② 観察方法

実験1　CPAの投与時期の違いによる臼歯と切歯形態の変化の観察：P1,P2,P4,P6,P8,P10のC57BL/6マウスにCPAを100 mg/kgでそれぞれ腹腔内に単回投与し，第三臼歯（M3）が萌出するP26で下顎骨を摘出した。その後，μCTで撮影を行い，下顎の第一臼歯(M1)，第二臼歯(M2)，M3，切歯を観察した。

実験2　CPAの投与濃度の違いによる第三臼歯(M3)形態の変化の観察：P4またはP6のC57BL/6マウスにCPAを100 mg/kg，50 mg/kg，25 mg/kgのいずれかの濃度で腹腔内に単回投与し，実験1と同様にμCTを用いてP26のM3を観察した。また，P26においてM3が欠如する確率を算出した。

実験3　P6マウスへのCPA投与後の頭蓋形態の変化の観察：P6のC57BL/6マウスに100 mg/kg のCPAを腹腔内に単回投与し，実験1と同様にμCTを用いてP26の頭蓋形態の変化を観察した。

実験4　対照群におけるM2，M3の組織学的変化と細胞増殖の観察：P1，P2，P4，P6，P8のC57/ BL6マウスあるいはK14-GFPマウスの下顎骨をそれぞれ摘出して脱灰した後に大臼歯の凍結切片を作成した。作成した切片は，HE染色により組織学的に解析を行い，歯胚の発生段階を観察した。また，抗Ki67抗体を用いて切片の免疫染色を行い，細胞増殖を解析した。

実験5　CPA(100 mg/kg)投与後のM3における組織学的変化と細胞動態の観察：P6のC57BL/6マウスあるいはK14-GFPマウスにCPAを100 mg/kgで投与し，投与0.5，1，2，4，6日後に実験4と同様に凍結切片を作成した。作成した切片は，HE染色により組織学的に解析を行った。抗BrdU抗体，抗Ki67抗体を用いて切片の免疫染色を行うことで細胞増殖を解析した。また，切片のTUNEL染色を行うことでアポトーシスを検出し，細胞死を解析した。細胞増殖・細胞死の定量的解析には，M3における染色陽性細胞数を上皮と歯乳頭の各領域で算出することで行った。算出した数値をStudentのt検定を用いて統計処理を行った。

実験6　CPA(100 mg/kg)投与後の切歯と歯槽骨における組織学的変化と切歯の細胞動態の観察：P6のC57BL/6マウスにCPAを100 mg/kgで投与し，投与0.5，1，2，4，6日後に実験4と同様に凍結切片を作成した。作成した切歯と歯槽骨の切片は，HE染色により組織学的に解析を行った。抗Ki67抗体を用いて切片の免疫染色を行うことで細胞増殖を解析した。また，切片のTUNEL染色を行うことでアポトーシスを検出し，細胞死を解析した。

【結果と考察】

１、CPA(100 mg/kg)の投与時期の違いによる大臼歯形態の解析：P1,P2のマウスへのCPA投与によりM2は矮小化し，M3は萌出遅延となった。P4,P6マウスへのCPA投与によりM3は欠如し，P8マウスへのCPA投与によりM3は矮小化したが，P10マウスへのCPA投与ではM3は矮小化しなかった。P1-P10のいずれの時期にCPAを投与してもM1,M2,M3は短根を示した。実験群のP26での切歯では，唇側と舌側に部分的に象牙質と歯髄が薄く狭窄しているniche-like defects(NLD)が観察され，唇側のNLDにおいてエナメル質は消失していた。切歯の唇側におけるNLDの部位は，CPAの投与時期が遅いほど後方に位置していた。これらの結果より，CPA投与は臼歯の発生段階特異的に多様な表現形を誘導し，切歯においても形成異常が生じる事が示された。

２、CPAの投与濃度の違いによるM3形態の解析：P4マウスへのCPA(50 mg/kg)投与によりM3は12.5%の確率で欠如し，P6マウスでのその確率は50%と大きい値を示した。P4,P6マウスに低濃度のCPA(25 mg/kg)を投与後には，どちらもM3が欠如することはなかった。この結果により，投与濃度の減少により歯の形成異常が軽減することとP4と比較してP6の時期のM3において歯の形成障害が著しいことが示された。

３、CPA投与後の頭蓋形態の解析：P6でCPA(100 mg/kg)を投与したマウスでは，P26の実験群の頭蓋骨では，上後頭骨と外後頭骨間の縫合の癒合，前頭鼻骨縫合の開大が観察された。また，実験群では，対照群と比較して後頭部の突出が緩やかであり，頭蓋全体は小さかった。これらの結果からCPAにより頭蓋形態の異常が生じることが明らかとなった。

４、臼歯の組織学的解析：対照群のマウスにおいて，M3の発生段階はP1，P2で蕾状期，P4で帽状期，P6,P8で鐘状期前期，P10で鐘状期後期であった。M2の発生段階はP1，P2で鐘状期前期，P4，P6，P8で鐘状期後期，P10で歯根形成期であった。P6でCPA(100 mg/kg)を投与したマウスでは，投与して2日後のP8からM3の内外エナメル上皮と歯乳頭の退縮が観察され，歯乳頭の細胞は疎になっていた。M3の歯胚の縮小はその後も進行し，投与して6日後にはM3は痕跡的となった。P6マウスのM3の形成段階は鐘状期前期であった。したがって，M3が鐘状期前期の時点でCPAを投与すると投与後6日で歯胚はほぼ消失することが判明した。

５、A)M3の細胞増殖の解析：対照群のマウスにおいて，P1のM3では歯胚の尖端，P1のM2とP6，P8のM3では歯乳頭全体と内エナメル上皮，P6，P8，P10のM2とP10のM3ではサービカルループとその周囲にKi67染色陽性細胞が観察された。P6でCPA(100 mg/kg)を投与したマウスでは，上皮と歯乳頭において投与して2日後からBrdUとKi67染色陽性細胞の有意な減少が観察され，P10まで減少し続けた。

B)M3の細胞死の解析：P6でCPA(100 mg/kg)を投与したマウスでは，上皮と歯乳頭において投与して1日後からTUNEL染色陽性細胞の有意な増加が観察され，CPA投与後4日のP10では減少していた。

これらの結果よりM3が鐘状期前期の時点でCPAを投与すると，CPA投与後1-2日の間に歯胚の上皮と歯乳頭において細胞増殖の減少とアポトーシスの増加が生じ，CPA投与4日後には歯胚の形成は停止し，細胞増殖とアポトーシスの減少が生じることが判明した。

６、切歯の組織学的解析・細胞動態の解析：P6でCPA(100 mg/kg)を投与したマウスの切歯では，P7，P8においてサービカルループ周囲のエナメル芽細胞，象牙芽細胞や歯髄細胞の退縮が生じ，TUNEL染色陽性細胞とKi67染色陽性細胞の増加が観察されたが，P10で同部位でのTUNEL染色陽性細胞がほぼ観察されなくなり，Ki67染色陽性細胞は対照群と同様の分布を示した。P10の実験群のサービカルループ周囲の細胞の形態は，対照群と同様の形態を示していた。

【結論】

本研究では，鐘状期前期への抗がん剤の投与が歯胚の著しい形成障害を引き起こし，欠如歯に至ることを示した。抗がん剤による歯の形成障害には，投与時期と投与濃度が重要であり，さらに投与濃度の減少により歯胚の形成障害は軽減することが示された。欠如歯に至る細胞動態としては，CPA投与直後に歯胚の細胞増殖減少とアポトーシスの増加が生じ，歯乳頭の細胞は疎になり，その後歯乳頭が消失して欠如歯に至ることが明らかとなった。また，切歯においても形態異常が生じ，切歯のサービカルループ周囲の細胞における，アポトーシスの増加や細胞増殖の分布の変化が形態異常の要因であることが示唆された。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　中津川　昂平　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	山城　隆
	副 査	教授	脇坂　聡
	副 査	准教授	中澤　敬信
	副 査	講師	大川　玲奈

論文審査の結果の要旨

本研究の目的は，抗がん剤のシクロホスファミド（CPA）を用い，抗がん剤の投与時期や投与濃度が歯胚形成に及ぼす影響を明らかにすることである。歯胚形成時のマウスにCPAを投与し，μCTを用いて臼歯を観察した結果より，歯の発生段階依存的に歯の形成異常の重症度が変化し，CPA 投与濃度の増加に伴い歯の形成異常が重症化することを明らかにした。CPA 投与後の鐘状期前期の臼歯では，アポトーシスの増加と細胞増殖の低下が生じ，臼歯が欠如に至ることを示した。また，切歯においてもCPA によるアポトーシスの増加や細胞増殖の低下による切歯の部位特異的な形成異常が生じることを示し，CPA 投与による歯の形成異常は歯胚における細胞動態の変化が関係していることが示唆された。

以上のことより、本研究の抗がん剤の投与時期や投与濃度が歯胚形成に及ぼす影響を形態学的・組織学的に明らかにした結果は，新たな知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。