

氏 名	小佐見 昂宏
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第7451号
学位授与の日付	令和 8年 3月 25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	星状網における Filamin A 依存的 EMT の歯の形態形成への影響
論文審査委員	岡村 裕彦 教授 寺町 順平 准教授 大野 充昭 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯胚の星状網 (stellate reticulum: SR) は、上皮性の細胞集団であるが、間葉細胞様の形態を示し、歯胚内部の機械的支持やシグナル伝達に関与することが知られている。一方、上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) は、上皮細胞が極性と細胞間接着を失い間葉様の形質を獲得する発生プログラムであり、顎顔面形態形成や歯の発生にも関与する。アクチン結合タンパク質 Filamin A (FLNA) は細胞骨格とシグナル伝達を統合し、細胞接着や転写制御を介して EMT を調節し得る分子である。しかしながら、顎顔面および歯の発生過程に EMT の関与は報告されているものの、SR における EMT が生じていることを示す直接的な証拠や、その現象が担う機能的役割については、いまだ十分に明らかにされていない。さらに、FLNA は EMT を調節し得る分子であるが、発生期エナメル器においてどのような役割を果たすかは明らかでない。本研究は、発生期マウス歯胚 SR において EMT が生じているかを検証し、FLNA が SR の EMT 制御および歯の形態形成、とくにエナメル質厚および関連形体指標に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料ならびに方法】

Flna コンディショナルノックアウト雄マウス (K14-Cre⁺; *Flna* flox/y) と同腹コントロール雄マウス (K14-Cre⁻; *Flna* flox/y) を作出し、胎齢 E13.5-E15.5 の歯胚を対象に免疫蛍光染色を行った。SR 領域における FLNA, EMT 誘導性転写因子 SNAIL, 間葉系マーカー N-cadherin および CD90 の発現を評価し、ImageJ で平均蛍光強度を算出したうえで DAPI 陽性核数で規格化し、コントロール平均を 1 とする相対値として定量した。形態学的評価には、同系統から得た生後 1 年~1 年 2 か月齢マウス下顎第一臼歯を用い、micro-CT により歯冠部の VOI を設定してエナメル質厚およびエナメル質体積を解析した。統計解析は平均±標準偏差 (SD) で示し、2 群間比較には対応のない t 検定または Welch 検定を用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

【結果】

E14.5 コントロール歯胚の免疫蛍光解析により、SR 領域に CD90 および N-cadherin の発現を認めた。次に、SR における間葉系細胞の発現と FLNA の関係を調べるために免疫蛍光染色を行った結果、間葉系マーカーの発現領域で FLNA の共局在を確認した。さらに、EMT 誘導性転写因子 SNAIL も SR で FLNA と共局在したことから、SR において EMT が起こっていることが示唆された。発生時期別に観察

すると、SR における FLNA シグナルは E13.5 および E14.5 で顕著であり、E15.5 では散在的で弱いシグナルにとどまり、FLNA 発現が歯胚発生初期の限られた時期に集中していることが示された。*Flna* コンディショナルノックアウトマウス (cKO) が SR 領域の EMT 関連シグナルに及ぼす影響を検証するために、E14.5 cKO およびコントロールマウスの歯胚の免疫蛍光染色を行った結果、SNAI1 および CD90 の相対蛍光強度がコントロールに比べて有意に低下し、SR の EMT 関連シグナルが抑制されていた。FLNA による EMT 制御が歯の形態形成に与える影響を評価するために行った micro-CT 解析では、cKO 個体においてエナメル質厚が有意に減少した一方、エナメル質体積には明瞭な差を認めなかった。

【考察】

本研究により、発生期歯胚の SR 領域において間葉系マーカーである CD90, N-cadherin および EMT 誘導性転写因子である SNAI1 の発現を確認したことから、SR 領域の細胞が間葉様性を獲得している可能性が高く、SR において EMT 様の現象が生じていることが示唆された。SR において FLNA と同一領域に、CD90, N-cadherin, SNAI1 が共局在し、さらに、FLNA をノックアウトすることにより、SNAI1, CD90 の発現がいずれもコントロールと比較して有意に低下したことから、FLNA は SR における EMT プログラムを調節する因子として機能することが考えられる。さらに、FLNA の発現が E13.5~E14.5 の限られた期間に強く認められたことは、歯胚発生初期における一過性の FLNA 活性が SR の EMT 状態を制御し、その後の歯の形態形成に影響する可能性を示す。また、cKO でエナメル質厚のみが低下し体積は保たれていたことから、FLNA 依存的 EMT は歯全体の形成量よりも局所的な厚みや形状制御に関与することが示唆された。一方、歯冠形態やエナメル質体積に大きな異常がみられなかった背景として、Filamin B や Filamin C など同族分子による機能補償の関与も考えられ、今後、これらの発現動態や役割を含めた詳細な検討が必要である。

【結論】

SR において FLNA が歯胚発生初期 (E13.5-E14.5) の EMT に関与し、上皮特異的 *Flna* 欠損は EMT 関連指標を低下させた。Micro-CT 解析では cKO 個体のエナメル質厚が低下しており、SR における EMT 制御が歯の形態形成に及ぼす影響が支持された。以上より、FLNA 依存的な細胞骨格・接着制御が SR の EMT 特性を介して、エナメル質厚を含む歯の最終的な形態を規定する可能性が示唆される。

論文審査結果の要旨

【緒言】歯胚の星状網（stellate reticulum: SR）は上皮性の細胞集団であるが、間葉細胞様の形態を示し、歯胚内部の機械的支持やシグナル伝達に関与するとされる。上皮-間葉転換（epithelial-mesenchymal transition: EMT）は、上皮細胞が極性と細胞間接着を低下させ、間葉様の形質を獲得する発生プログラムであり、顎顔面形態形成や歯の発生への関与が報告されている。アクチン結合タンパク質 Filamin A（FLNA）は細胞骨格とシグナル伝達を統合し、細胞接着や転写制御を介して EMT を調節し得る分子である。しかしながら、SR における EMT の直接的な実証や機能的意義は十分に明らかでない。さらに、FLNA が SR における EMT にどのように関与するかも不明である。そこで本研究では、SR における EMT の有無を検証し、FLNA がその EMT 制御および歯の形態形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】上皮特異的 *Flna* コンディショナルノックアウト雄マウス（K14-Cre⁺; *Flna*^{flox/y}; 以下 cKO）およびコントロール雄マウス（K14-Cre⁻; *Flna*^{flox/y}; 以下 Cont）を作出し、胎齢 E13.5–E15.5 歯胚の免疫蛍光染色を行った。SR 領域における FLNA, EMT 誘導性転写因子 SNAI1, ならびに間葉系マーカー N-cadherin および CD90 の発現を評価した。形態学的評価には、生後 1 年～1 年 2 か月齢マウス下顎第一臼歯を用い、micro-CT にてエナメル質厚およびエナメル質体積を解析した。

【結果】E14.5 歯胚の免疫蛍光解析では、SR 領域に CD90 および N-cadherin の発現を認め、それらの発現領域で FLNA の共局在を確認した。さらに、SNAI1 も SR で FLNA と共局在した。発生時期別の観察では、SR における FLNA シグナルは E13.5, E14.5 で顕著であったが、E15.5 では減弱していた。*Flna*-cKO の影響を検証したところ、E14.5 歯胚の SR における SNAI1 および CD90 の相対蛍光強度は Cont と比較して有意に低下した。Micro-CT 解析では、cKO 個体でエナメル質厚が有意に減少した一方、エナメル質体積には明瞭な差を認めなかった。

【考察】本研究では、発生期歯胚の SR 領域において、CD90 および N-cadherin の発現に加えて SNAI1 の発現と FLNA の共局在を確認したことから、SR 細胞が間葉様性を示し、SR において EMT 様の現象が生じている可能性が示唆された。さらに、*Flna*-cKO で SR における SNAI1 および CD90 の発現が低下したことから、FLNA が SR における EMT に関与する可能性が示唆された。また、SR における FLNA シグナルが E13.5, E14.5 で強く、E15.5 で減弱したことは、SR における FLNA 活性は限られた時期に機能している可能性が示唆された。加えて、micro-CT 解析でエナメル質厚は低下したが体積は保たれていたことから、FLNA 依存的な制御は形成量そのものよりも、局所的な厚みや形状の調節に関与する可能性が示唆された。一方、歯の形態形成に明瞭な異常がみられなかった要因として、Filamin B（FLNB）や Filamin C（FLNC）などの同族分子による機能補償が関与している可能性が考えられる。

本研究では FLNA が発生期歯胚の星状網における EMT を制御する可能性があるという新しい知見を得た。この成果は新規性に富んでおり、歯の発生に関する有用な知見である。よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。