

## 歯の発生における基底膜分子Nephronectinの役割

新井, 智映子

<https://hdl.handle.net/2324/1806931>

---

出版情報：九州大学, 2016, 博士（歯学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏名	新井 智映子			
論文名	歯の発生における基底膜分子 Nephronectin の役割			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	平田 雅人
	副査	九州大学	教授	前田 英史
	副査	九州大学	教授	久木田 敏夫

## 論文審査の結果の要旨

歯や唾液腺、肺、腎および毛など体を構成する様々な器官は上皮-間葉相互作用によって形成され、その発生過程において、上皮と間葉の間に介在する基底膜は細胞外マトリックス因子として複雑なシグナルネットワークを構成している。本研究では基底膜分子 Nephronectin (Npnt) に着目した。Npnt は EGF like repeat 配列、RGD 配列、MAM 配列を有する細胞外マトリックスとして同定され、その遺伝子欠損マウスでは腎臓の形成不全が生じることが報告されているが、歯の発生における役割は不明である。そこで、歯胚発生における Npnt の役割を明らかにすることを目的として本研究を行った。

初めに、RT-qPCR 法および免疫染色法を用いて Npnt の発現パターンを解析した。Npnt は歯、肺および腎臓に強く発現し、歯においては特に形態形成期に基底膜に強い発現を認めた。さらに歯原性上皮幹細胞と Npnt の局在を確認するため、歯原性上皮幹細胞マーカーである Sox2 との二重染色を行った。Sox2 陽性細胞は臼歯歯胚の舌側に存在するのに対し、Npnt は頬側基底膜に強く局在することが判明した。さらに生後1日齢切歯を用いて染色を行い、マウス切歯幹細胞ニッチとして知られるサービカルループ近傍において、Npnt の発現が上昇すると、Sox2 陽性細胞が減少することが分かった。次いで器官培養法において siRNA により Npnt の発現を抑制すると、臼歯歯胚頬側に異所性に Sox2 陽性細胞が認められた。以上から Npnt は歯原性上皮幹細胞の分化制御に関わる可能性が示唆された。また、生後4ヶ月マウスの下顎切歯サービカルループより歯原性上皮幹細胞株 (M3H1) を作製し、Npnt の歯原性上皮細胞に与える影響を解析した。Npnt 組換え体をコーティングした培養皿に M3H1 細胞を播種すると、Sox2 陽性細胞が減少し、細胞増殖能が増加した。さらに Npnt を構成する各ドメインの役割を検討するために、全長 Npnt (Npnt-FL) およびそれぞれのドメインを欠損させた発現ベクター (Npnt-ΔRGD, Npnt-ΔEGF) を作製し、機能解析した。Npnt-FL 遺伝子導入細胞では Sox2 陽性細胞が減少し、細胞増殖能が増加したが、EGF like repeat 配列を欠失した Npnt-ΔEGF では変化が認められなかった。以上の結果から EGF like repeat 配列が歯原性上皮幹細胞の分化に重要であることが示唆された。そこで、この培養系に EGF 受容体の阻害剤 (Gefitinib および Lapatinib) を添加したところ、Npnt-FL 遺伝子導入細胞にみられる Sox2 陽性細胞の減少と細胞増殖能の増加は抑制された。さらに EGF シグナリング経路を検討したところ、Npnt は Akt のリン酸化を介していることが分かった。以上から、Npnt は EGF シグナル伝達経路を介して Sox2 の発現を調節することで歯原性上皮幹細胞分化において重要な役割を果たしていることが示された。本論文は多くの新知見を含んでおり、博士(歯学)の学位授与に値する。