# 学位申請論文

マウス歯胚の発育に対する抗がん剤の影響についての 組織学的および分子生物学的検討

角田 陽子

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 小児歯科学分野

## 主任教授

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児歯科学分野 仲野 道代

## 緒 言

小児がんは、15歳以下の小児に発生する悪性の血液腫瘍と固形腫瘍の総称で ある。我が国においては、年間 2,000~2,500 人が診断を受けており、そのうち 約4割が血液腫瘍であり、急性リンパ性白血病が大部分を占める。近年、小児 がん治療の成績は顕著に向上し、小児がん患者の約8割が治癒し、多くが成人 期を迎えている<sup>1)</sup>。一般的な治療では、化学療法、放射線療法、外科療法、骨髄 移植などの集学的な治療法が用いられており、小児においても、数種類の抗が ん剤を用いる多剤併用化学療法 <sup>2,3)</sup> や頭蓋部を含む放射線療法などが行われて いる。しかし、小児がんの治療成績の向上が注目される一方で、小児がん治療 経験者における晩期合併症の出現が報告されている。晩期合併症とは、がん治 療に起因する直接的または間接的な障害であり、小児がん治療経験者の約7割 が晩期合併症を抱えているとの報告もある<sup>4,5)</sup>。代表的な晩期合併症として,低 身長などの成長発達障害, 内分泌器や消化器, 循環器, 生殖器の機能異常など, 身体の各部位において様々な合併症が報告されている<sup>6</sup>。一方で、口腔内におけ る代表的な晩期合併症としては、永久歯の先天性欠損や矮小歯などの発育異常、 歯根短小化,歯の形成不全による変色などが報告されている<sup>7-10)</sup>が,その具体的 な発生機序については明らかにされていない。

急性リンパ性白血病患児に対して行われる多剤併用化学療法では、アルキル化剤であるシクロフォスファミド製剤が使用されることが多い 11)。これは、DNA の複製を阻害するとともに DNA 本体にも傷害を与え、抗腫瘍効果を発揮する 12)。小児がんにみられる晩期合併症は、化学療法実施時期により発生臓器や障害の程度に差があるとされており、歯の異常については、多くは永久歯の第一小臼歯、第二小臼歯、第二大臼歯にみられる。小児がんの好発年齢と治療の時期を考えると、帽状期以降の永久歯歯胚が化学療法の際に影響を受けていることが予想される。これまで、口腔領域におけるシクロホスファミド製剤の影響については、成熟したげっ歯類の切歯形成やマウスの臼歯の歯根形成に対する影響についての報告はあるが 13,14)、鐘状期歯胚の発育への影響を調べた研究は少ない。

歯胚の分化は、胎生期における外胚葉性の上皮組織の肥厚部である歯堤から開始し、基底膜を介した上皮性成分と間葉性成分の相互作用により進行する <sup>15-18)</sup>。上皮性成分にはサイトケラチン 14(CK14)が、間葉性成分にはビメンチンが、細胞外基質として、I型コラーゲンやフィブロネクチンが存在し、歯胚の形成

に関与している。CK14 は、扁平上皮の基底細胞に発現し、歯胚の内エナメル上皮においては、前エナメル芽細胞やエナメル芽細胞に強く発現し、上皮細胞の分化が進行すると、発現が増強する <sup>19)</sup>。ビメンチンは、間葉系細胞の細胞骨格に発現し、歯胚においては、歯髄細胞や象牙芽細胞に発現が強く認められる <sup>20)</sup>。 I型コラーゲンは歯の細胞外基質の主要な有機質であり、歯の発生期における歯乳頭において発現し、象牙芽細胞により合成されるとの報告がある <sup>21,22)</sup>。フィブロネクチンは歯の発生期と硬組織形成過程において、内エナメル上皮と象牙芽細胞との間の基底膜に局在するとの報告があり、象牙芽細胞の分化への関与が示唆されている <sup>22,23)</sup>。しかし、これらの発現に対する抗がん剤の作用については十分に解明されていない。

本研究は、マウス下顎第一臼歯歯胚の器官培養を行い、鐘状期歯胚にアルキル化剤の一つであるシクロホスファミド製剤を作用させ、歯胚の発育に与える影響について、歯胚を構成する細胞の分化と細胞が産生する関連因子に着目し、組織学的および分子生物学的解析を行った。

## 材料と方法

#### 1. 実験動物

マウス実験は、岡山大学動物実験委員会の承認を得て行った。妊娠 16 日齢の ICR マウス雌 (日本クレア、東京) より、実体顕微鏡下 (SZ61, Olympus、東京) において、胎児の下顎第一臼歯鐘状期歯胚を 180 個採取し、実験に供試した (図1)。

## 2. 器官培養

胎生 16 日齢のマウスより下顎第一臼歯の歯胚を採取後、0.5%アスコルビン酸 (和光純薬、大阪) および 0.5%ペニシリン-ストレプトマイシン (gibco® by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 含有 BGJb Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて  $37^{\circ}$ C、5% CO $_{2}$  下にて Trowell 変法  $^{24,25)}$  による器官培養を行った。培養 1 日目にシクロホスファミド製剤(エンドキサン、シオノギ製薬、大阪)を培養液中の濃度が 0.11 mg/ml、0.21 mg/ml、0.42 mg/ml 添加 器、0.21mg/ml 添加群、0.42mg/ml 添加群とした。また、対照として、シクロ

フォスファミド非添加群 (非添加群) を設定した。シクロフォスファミド製剤の 濃度は、ヒトに使用されている血中濃度をもとに、培養液中で再現した。培養 液の交換は隔日で行い、培養7日目、14日目および21日目における歯胚を実験 に供試した(図2)。

#### 3. 病理組織学的解析

下顎第一臼歯歯胚を10%中性ホルマリン (和光純薬) にて固定し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、エタノール (和光純薬) を用いて脱水およびクロロホルム (和光純薬) を用いて脱アルコールを行い、パラフィン包埋を行った。パラフィン包埋ブロックより 薄さ5 μm の連続切片を作製し、切片のヘマトキシリン・エオジン (Haematoxylin-Eosin: HE) 染色による病理組織学的検討を行った。

#### 4. 蛍光免疫組織化学的解析

歯胚の分化は、基底膜を介した上皮性成分と間葉性成分の相互作用により進行することから、上皮性成分として CK14、間葉性成分としてビメンチン、基底

膜を介した上皮-間葉相互作用に関与すると考えられる細胞外基質の成分として、I型コラーゲンやフィブロネクチンの発現を確認するため、蛍光二重染色法による蛍光免疫組織化学的解析を行い、オールインワン蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-X700、キーエンス、大阪) にて観察を行った <sup>26</sup>。上記の方法で作製したパラフィン切片を用いて、一次抗体として、表 1 に示す抗体を使用し、4°C で一晩反応させた。翌日、各一次抗体に対しての二次抗体である Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150109、1:500、Abcam、UK) および Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 647) (ab150075、1:500、Abcam)を室温で遮光下にて 40 分反応させ、Hoechst 33342 solution (同仁化学研究所、熊本) による核染色も合わせて行った。その後、蛍光顕微鏡による観察に供した。

#### 5. Total RNA の抽出

胎生 16 日齢および培養 7 日目, 14 日目, 21 日目の歯胚について, 歯胚の RNA 抽出を行った。RNA 抽出は, 各日, 各濃度の歯胚を, それぞれ 12 個用いた。歯胚の RNA 抽出は Acid-guanidinium-phenol-chloroform 法 <sup>27)</sup>に基づいておこなった。RNAgents<sup>®</sup> Denaturing Solution (Promega, Madison, WI, USA) 600µl に同様の

条件で培養した歯胚を 3 個懸濁し、Sodium acetate、2M、pH4.2 (VWR International、Radnor、PA、USA) 60 μl およびフェノール:クロロホルム 5:1 (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA) 600μl を添加し遠心分離(10,000g、20分、4°C)を行った。この上清 400 μl を採取し、3M Sodium acetate 13 μl および Ethachinmate(ニッポンジーン、東京)3 μl、100% エタノール 800 μl を添加した。 さらに遠心分離(10,000g、5分、25°C)を行い、得られた沈殿を70%エタノール 600 μl にて洗浄して乾燥後、Diethylpyrocarbonate(DEPC)処理水(Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)10 μl に溶解させた。

## 6. cDNA の合成

回収した全 RNA に, Oligo dt (Invitrogen) 1 μl, dNTP mix (Invitrogen) 1 μl, DEPC 処理水 2 μl を添加し, 65°Cで 5 分間反応させた。1 分間氷上で静置した後, 5×First-Stand Buffer, 0.1M DTT, RNase out, Super ScriptIII® (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応を行い, cDNA を合成した。

#### 7. リアルタイム PCR による定量的遺伝子解析

得られた cDNA を鋳型として、CK14、ビメンチン、I型コラーゲン、フィブロネクチンの各タンパクをコードする遺伝子の発現量を SYBR green® (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) を用いた Real-time Quantitative Reverse transcription-PCR (Real-time qRT-PCR) 法により調べた。遺伝子増幅反応ならびに蛍光強度の測定には Step One Plus<sup>TM</sup> (Applied Biosystem、Foster City、CA、USA)を使用した。Real-time qRT-PCR は95℃で10秒、65℃で30秒のステップを40サイクル繰り返した。各遺伝子の増幅には、表2に示すプライマーを用いた。各プライマーは、増幅サイズ125~250bp、プライマーサイズ18~30塩基、GC含有量43~71%、Tm 値48~59℃の条件で設計して合成し、理論上特異的な増幅をNCBI primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)を用いて確認した。また、目的遺伝子の発現量は、β-actinを内部標準として補正した。

#### 8. 統計処理

得られた結果は、平均 $\pm$ 標準偏差で示し、有意差検定は Student's t 検定を用いて行った。

## 結 果

#### 1. 培養歯胚の病理組織学的評価

培養 1 日目の非添加群では、歯胚全体の外形は歯軸方向に薄く、水平方向に厚い楕円形を呈し、歯乳頭を取り囲むようにエナメル器が発達していた。エナメル器の形状は鐘様の形態を示しており、内エナメル上皮は、将来の歯冠側へ沿った深い陥凹状を呈していた。内エナメル上皮は単層立方上皮細胞からなり、基底膜に沿って整然と配列していた。内エナメル上皮の中央部ではその高さを増していた。内エナメル上皮の直下では、立方形からやや背の高い細胞が歯乳頭表層に一層配列していた。明らかな象牙質の形成は生じていなかった(図 3a、b)。

培養 14 日目の非添加群では、歯胚全体の外形は歯軸方向に厚みを増した類円形を呈していた。歯乳頭を取り囲むエナメル器では内エナメル上皮の陥凹がさらに著明であった。エナメル芽細胞は単層立方状から高円柱状を呈し、歯乳頭表面を覆うように規則正しく整然と配列していた。高円柱状のエナメル芽細胞では、基底膜側から離れた位置に核が分布し、細胞極性が明瞭であった。内エナメル上皮の直下では、分泌側から遠位に位置する核を有する背の高い象牙芽

細胞が、歯乳頭表層に一層配列していた。これらの細胞は象牙質基質を産生していた (図 4a, b)。

培養 14 日目の 0.11mg/ml 添加群, 0.21 mg/ml 添加群では, 培養 14 日目の非添加群と同様の所見であった (図 4c, d, e, f)。

培養 14 日目の 0.42 mg/ml 添加群では、歯胚の外形は類円形を呈していたが、 培養 14 日目の非添加群と比べ小さく、特に歯乳頭の占める割合が低下していた。 内エナメル上皮は、培養 14 日目の非添加群と比べ高さが低く、エナメル芽細胞 の核の極性は不明瞭であった。内エナメル上皮直下では、培養 14 日目の非添加 群と比べ小型で極性に乏しい象牙芽細胞が存在し、配列は不整であった。また、 象牙質の形成量が低下する傾向が認められた(図 4g,h)。

培養 21 日目の非添加群では、歯胚全体の外形は歯軸方向、水平方向ともに厚みを増し、類円形を呈していた。歯乳頭を取り囲むエナメル器では、内エナメル上皮の陥凹がさらに顕著に認められた。内エナメル上皮のエナメル芽細胞は高円柱状を呈し、規則正しく整然と配列していた。高円柱状のエナメル芽細胞では、基底膜側から離れた位置に核が分布して細胞極性が明瞭であった。エナメル質の形成が内エナメル上皮の陥凹部および咬頭相当部において認められた。

象牙芽細胞は円柱状を呈して歯乳頭表層に一層配列しており、分泌側から遠位に位置する核を有していた。これらの細胞は象牙質基質を産生していた(図 4i,j) 培養 21 日目の 0.11 mg/ml 添加群では、内エナメル上皮のエナメル芽細胞は培養 21 日目の非添加群と比べて高さが低く、核の極性は不明瞭であった。歯胚全体の形状、エナメル質の形成部位、象牙芽細胞の形状、配列、象牙質形成の状態に関しては、培養 21 日目の非添加群と同様の所見であった。(図 4k,l)。

培養 21 日目の 0.21mg/ml 添加群では、歯胚の外形は類円形を呈していたが、21 日目非添加群と比べ小さかった。内エナメル上皮は、培養 21 日目の非添加群と比べ高さが低く、エナメル芽細胞の核の極性は不明瞭であった。内エナメル上皮直下では、培養 21 日目の非添加群と比べ、小型で極性に乏しい細胞が存在し、配列は不整であった。象牙質の形成量については、培養 21 日目の非添加群と比較して顕著な差は認められなかった(図 4m,n)。

培養 21 日目の 0.42mg/ml 添加群では、歯胚の外形は楕円形を呈していたが、 培養 21 日目の非添加群と比べ顕著に小さく、特に歯軸方向への厚みは薄く、歯 乳頭の占める割合も低下していた。内エナメル上皮は、培養 21 日目の非添加群 と比べ明らかに高さが低く、エナメル芽細胞の核の極性は不明瞭であった。内 エナメル上皮直下では、培養 21 日目の非添加群と比べ小型で極性に乏しい細胞が存在し、配列は不整であった。象牙質の形成量については、培養 21 日目の非添加群と比較して低下する傾向が認められた。(図 4o,p)。

#### 2. 培養歯胚の蛍光免疫組織化学的評価

培養1日目の非添加群におけるCK14の発現は、上皮細胞に相当するエナメル 芽細胞において、CK14の発現を示す緑色の発色は認められなかったが (図 5a)、 培養14日目の非添加群および培養21日目の非添加群では、エナメル芽細胞に CK14の発現が認められた (図 5e, m)。培養14日目の非添加群と比較して、培養21日目の非添加群において、エナメル芽細胞に CK14の発現を示す緑色の発色が強く認められた。一方、0.21mg/ml添加群においては、14日目、21日目ともに非添加群と比較して、エナメル芽細胞に CK14の発現を示す緑色の弱い発色が認められ、培養14日目の0.21mg/ml添加群と比較して、エナメル芽細胞に CK14の発現を示す緑色の弱い発色が認められ、培養14日目の0.21mg/ml添加群と比較して、培養21日目の0.21mg/ml添加群においては発色が強く認められた (図 5i, q)。

培養 1 日目の非添加群におけるビメンチンの発現は、歯乳頭における歯髄細胞や象牙芽細胞にビメンチンの発現を示す赤色の発色は認められなかったが

(図 5b), 培養 14 日目の非添加群および培養 21 日目の非添加群においては、歯髄細胞や象牙芽細胞にビメンチンの発現を示す赤色の発色が認められた (図 5f, n)。14 日目と比較して、21 日目において歯乳頭の歯髄細胞や象牙芽細胞にビメンチンの発現を示す赤色が強く認められた。一方、0.21mg/ml 添加群においては、14 日目、21 日目ともに非添加群と比較して、歯乳頭の歯髄細胞や象牙芽細胞にビメンチンの発現を示す赤色の弱い発色が認められ、14 日目と比較して、21 日目では発色は弱かった。 (図 5j,r)

培養 1 日目の非添加群における I 型コラーゲンの発現は、象牙芽細胞に I 型コラーゲンの発現を示す緑色の発色は認められなかったが (図 6a), 培養 14 日目の非添加群において象牙芽細胞に緑色の発色が認められ、培養 21 日目の非添加群においては象牙芽細胞に強い緑色の発色が認められた (図 6e, m)。0.21mg/ml添加群においては、14 日目、21 日目ともに非添加群と比較して、象牙芽細胞に I 型コラーゲンの発現を示す緑色の弱い発色が認められ、培養 14 日目の0.21mg/ml添加群においては強い発色が認められた (図 6i, q)。

培養 1 日目の非添加群におけるフィブロネクチンの発現は、歯乳頭および上

皮-間葉細胞の境界面である基底膜にフィブロネクチンの発現を示す赤色の発色は認められなかったが (図 6b), 培養 14 日目の非添加群において歯乳頭および上皮-間葉細胞の境界面である基底膜にフィブロネクチンの発現を示す赤色の発色が認められ、培養 21 日目の非添加群において基底膜に強い発色が認められた (図 6f,n)。0.21mg/ml 添加群では、14 日目、21 日目ともに非添加群と比較して、歯乳頭および上皮-間葉細胞の境界面である基底膜にフィブロネクチンの発現を示す赤色はほとんど認められなかった (図 6j,r)。

#### 3. 遺伝子発現量の評価

PCR の結果より、CK14の発現は、非添加群と比較して 0.21mg/ml 添加群において、培養 7 日目、14 日目、21 日目において有意な発現の増加を認めた(図 7a)。 ビメンチンの発現は、培養 7 日目と 14 日目では、非添加群と 0.21mg/ml 添加群との間に有意な差は認められなかったが、21 日目においては、非添加群と比較して 0.21mg/ml 添加群において、有意に発現の低下を認めた(図 7b)。I 型コラーゲンの発現は、培養 7 日目、14 日目では、非添加群と比較して、0.21mg/ml 添加群において発現が有意に低下した。培養 21 日目においては、0.21mg/ml 添加群において発現が有意に低下した。培養 21 日目においては、0.21mg/ml 添加群

では非添加群と比較し、発現の低下は認めたが、有意な差は認められなかった (図 7c)。フィブロネクチンの発現は、非添加群と比較して 0.21mg/ml 添加群において、培養 7 日目や 14 日目では、発現に有意な差は認められなかったが、21 日目では、有意な発現の低下を認めた (図 7d)。

## 考 察

小児がんは発見が難しく,がん細胞の増殖が速いことが特徴であるが,成人のがんに比べて化学療法や放射線療法の効果が極めて高いことが報告されている <sup>11)</sup>。現在では,放射線療法,化学療法の進歩により,生存率が,がんの種類によって違いはあるが,70~80%となってきた <sup>1)</sup>。その一方で,長期生存率が上がるにつれ,小児がん患者における様々な晩期合併症が明らかとなってきた <sup>1,4-6)</sup>。口腔領域の晩期合併症の代表的な症状として,歯の先天性欠損や歯根短小化などが報告 <sup>5,6)</sup>されているが,矮小歯など他の歯の形成障害に関する詳細なメカニズムは明らかとされていない。

抗がん剤の一つであるシクロホスファミド製剤は、細胞分裂や増殖が盛んながん細胞に対して DNA 合成阻害として強く作用する一方で、成長期の組織において急速に増殖する細胞に対しても作用するため、がん細胞と同時に健常な細胞・組織、特に骨髄、リンパ組織、口腔・皮膚上皮において多くの影響が副作用として現われる <sup>28)</sup>。副作用として、主に骨髄抑制のほか、悪心、脱毛、粘膜障害の報告は数多いが、歯に対する影響についての報告は少ない。本研究では、シクロホスファミド製剤を用いて、胎生 16 日齢のマウス下顎第一臼歯にお

ける歯胚の発育と細胞分化に及ぼす影響について検討を行った。

マウス第一臼歯は、帽状期において内外エナメル上皮およびエナメル器の境界が明瞭となり、徐々に間葉組織の上皮組織への嵌入が生じる。鐘状期では、歯冠の形態が明瞭となり、エナメル上皮が歯根方向へ伸長し、歯根形成が進行するといわれている <sup>15-18</sup>。本研究では、小児がん患者における永久歯歯胚形成期における抗がん剤の影響を再現するため、マウス下顎第一臼歯における鐘状期を抗がん剤投与時期と設定し、歯胚の発育、硬組織形成細胞の分化、基質形成に対するシクロホスファミド製剤の影響についての観察を行った。

シクロホスファミド製剤の歯根形成への影響を観察した過去の研究によると、 げっ歯類の無根歯である切歯部を対象としたものが多く <sup>13)</sup>、臼歯部における報 告は少ない。ラット切歯を用いた報告では、シクロホスファミド製剤をラット の腹腔内に投与後、前象牙芽細胞や分化増殖期の象牙芽細胞の核崩壊や壊死な どの変化が起こり、引き続いて象牙質減形成や象牙質の形成停止が認められて いる <sup>29,30)</sup>。また、臼歯部を観察対象としている Nässman ら <sup>15)</sup>によると、生後 10日および13日のラットにシクロホスファミド製剤 30 mg/kg を腹腔内投与し たところ、投与後2日で上顎第一臼歯の歯根形成が停止し、投与後6日で部分 的に石灰化した骨様象牙質によって根尖が閉鎖したと報告している。さらに、Satoh ら<sup>31)</sup>の報告では、シクロホスファミド製剤だけでなく、シスプラチン、5-FU、アドリアマイシンなど他の様々な機序で作用する抗がん剤も、マウス切歯の象牙芽細胞の分化前の細胞に変化を与え歯根形成に影響を及ぼすことが示されている。これらのことは、化学療法を小児期にうけた小児がん治療経験者において歯根短小化や形態異常などが現れた症例報告<sup>9)</sup>や統計データ<sup>10)</sup>を裏付けており、シクロホスファミド製剤は歯根形成に対して抑制的に作用し、歯根短小化の誘因となることが示唆される。

歯胚の形成にはエナメル器の上皮細胞と間葉系細胞の両者が関与しており、特に形成の初期段階においては両者の細胞間での相互作用によって、互いの細胞分化が時空間的に進行する <sup>15-18)</sup>。歯胚の形成の後期となる歯根形成においては、エナメル器に由来するヘルトヴィッヒ上皮鞘、歯乳頭および歯小嚢が関与しており、特にヘルトヴィッヒ上皮鞘は歯根の形態を決定するうえで重要である <sup>32)</sup>。エナメル器の基底部が増殖してできたサービカルループは、歯冠形成が完了後に、内外エナメル上皮が増殖癒合し二層となることでヘルトヴィッヒ上皮鞘が形成される <sup>32)</sup>。ヘルトヴィッヒ上皮鞘の連続性が形成途中で停止すると、そ

の部位での象牙芽細胞の分化や誘導が起こらず,象牙質形成は認められない33%。 歯根形成におけるヘルトヴィッヒ上皮鞘の機能的役割は、上皮間葉相互作用を 介して象牙芽細胞の増殖、分化、誘導に働き、象牙質基質の産生を調整するこ とで歯根長や歯根形態を決定するとされている<sup>33)</sup>。またヘルトヴィッヒ上皮鞘 は、歯根形成のほか、歯周組織形成の誘導も担うことが明らかになっており、 そのシグナルを発する重要な役割も果たしている<sup>34,35)</sup>。Orban<sup>36)</sup> によると、上 皮間葉相互作用は両者の細胞間に存在する基底膜を介して行われて、基底膜が 歯胚の分化や基質形成に関与している可能性があると示唆している。Thesleff 22,37) らによると、象牙芽細胞の分化には基底膜が必要であり、フィブロネクチ ンにより仲介される基底膜と間葉細胞の接触により、象牙芽細胞分化が起こっ ていると報告されている。また、I型コラーゲンは歯の細胞外基質の主要な有 機成分であり、象牙芽細胞により合成される 22)。

本研究では、歯胚の発達段階における帽状期のマウス下顎第一臼歯の歯胚にシクロホスファミド製剤を 1 回作用させ、下顎第一臼歯の歯胚の発育、硬組織形成細胞の分化、基質形成についての変化を観察した。組織学的解析の結果では、実際に小児がん患者に投与されている濃度の 0.42mg/ml 添加群では、明らか

な歯胚の形態異常や発育障害が認められ、歯胚の広範囲に影響がみられた。一 方で、さらに低い濃度の0.21mg/ml添加群においては、内エナメル上皮細胞と歯 乳頭細胞の分化抑制、象牙質の形成障害が認められ、エナメル芽細胞や象牙芽 細胞の配列の乱れなど種々の影響が生じることによって、歯胚の発育抑制に伴 う歯冠の形態異常, 内エナメル上皮細胞と歯乳頭細胞の分化の抑制に伴うエナ メル質形成不全、象牙質の形成量の低下などの硬組織形成障害が生じているこ とが明らかとなった。また、分子生物学的解析の結果では、シクロフォスファ ミド製剤を作用させた歯胚では、CK14 と I 型コラーゲンは歯胚形成期におけ る鐘状期前期に影響が出現し、ビメンチンとフィブロネクチンは、鐘状期後期 に影響が出現することを示しており、これらの結果は、組織学的解析の結果を 強く裏付けるものと考えられた。これまでに小児がん治療の晩期合併症として. 歯根形成の早期停止と歯根短小化が報告され、障害発生のメカニズムは徐々に 解明されつつある。今回の結果は、臼歯の歯冠形成不全、エナメル質と象牙質 をはじめとする歯の硬組織の形成障害が生じることを強く示唆するものである。 しかし、これらの晩期合併症として、シクロフォスファミド製剤が細胞の分化 やエナメル器形態形成を制御している機序に及ぼす影響ついては明らかとなっ

ていないため、歯胚におけるエナメル器の形成と上皮間葉相互作用に関連する 因子ひいては内エナメル上皮細胞と歯乳頭細胞の分化をコントロールしている 因子についても検討を行い、抗がん剤が歯の形成に影響を与える機序に関して、 今後さらなる検討を行っていく必要があると考えらえる。

本研究においては、マウスの臼歯における歯胚の発育に関して検討を行ったが、マウスのみでなく、ウサギやイヌなどの、よりヒトに近い動物モデルにおいても抗がん剤が歯胚の発育に及ぼす影響に関して検討を行う必要があると思われる。

#### 結 論

小児がん治療で用いる抗がん剤が歯牙形成に及ぼす影響を明らかにするために、シクロホスファミド製剤を歯牙形成途上にあるマウス歯胚に作用させ、経目的に下顎第一臼歯形成への影響を調査した。歯根形成期マウス歯胚へシクロホスファミドを作用させることにより、おそらく内エナメル上皮細胞と歯乳頭細胞の正常な増殖と分化を阻害するため、そこから分化するエナメル芽細胞と象牙芽細胞の規則的配列とタンパク産生の障害を引き起す可能性が示唆された。また、その結果、歯冠の形態異常、象牙質の形成量の低下などの組織学的な影響が現れることが示唆された。また、シクロフォスファミド製剤による CK14 と I型コラーゲンの発現に対する影響は鐘状期前期に強く現れ、ビメンチンとフィブロネクチンの発現に対する影響は鐘状期後期に現れることが示唆された。

以上より、歯胚形成期における抗がん剤の投与により、上皮組織と間葉組織の双方に影響を与え、抗がん剤の投与がマウスの鐘状期歯胚の発育異常とエナメル芽細胞と象牙芽細胞の分化抑制による歯冠形成の異常に関与することが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の仲野道代教授に心から感謝致します。また、様々な面にわたり貴重な御助言と御協力をくださいました、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Hampton, T.: Cancer treatment's trade-off: years of added life can have long-term costs. *JAMA*., **294**, 167–168, 2005.
- Smith, M., Arthur, D., Camitta, B., Carroll, A.J., Crist W., Gaynon P., Gelber R., Heerema N., Korn E.L., Link M., Murphy S., Pui, C.H., Pullen, J., Reamon, G., Sallan, S.E., Sather, H., Shuster, J., Simon, R., Trigg, M., Tubergen, D., Uckun, F., Ungerleider, R.: Uniform approach to risk classi- fication and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 14, 18-24, 1996.
- 3) Pui, D.H., Evans, W.E., and Gilbert, J.R.: Meeting report: International Childhood ALL Workshop: Memphis, TN, 3-4 December 1997.: *Leukemia.*, **12**, 1313-1318, 1998.
- 4) Maeda, M.: Late effects of childhood cancer: life-threatening issues., *J Nippon Med Sch.*, **75**, 320-324, 2008.
- 5) Oeffinger, K.C., Mertens, A.C., Skler, C.A., Kawashima, T., Hudson, M.M., Meadows, A.T., Friedman, D.L., Hobbie, W., Kadan-Lottick., N.S., Schwartz,

- C.L.: Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med.*, **355**, 1572–1882, 2006.
- Dickerman, J.D.: The Late Effects of Childhood Cancer Therapy. *Pediatrics.*, 119, 554-568, 2007.
- 7) Hölttä, P., Alaluusua, S., Saarinen-Pihkala, U.M., Peltola J., Hovi, L.: Agenesis and microdontia of permanent teeth as late ad- verse effects after stem cell transplantation in young children., *Cancer.*, **103**, 181-190, 2005.
- 8) Vesterbacka, M., Ringdén, O., Remberger, M., Huggare, J., Dahllöf, G.: Disturbances in dental development and craniofacial growth in children treated with hematopoietic stem cell transplantation., *Orthod Craniofac Res.*, 15, 21-29, 2012.
- 9) Nomura, R., Nakano, K., Inagaki, S., Taniguchi, N., Okawa, R., Matsumoto, M.,
  Ooshima, T.: Developmental anomalies of permanent teeth identified in children
  who received chemotherapy.: Report of three cases., *Pediatric Dental Journal.*, **20**,
  216-221, 2010.
- 10) Proc, P., Szczepańska, J., Skiba, A., Zubowska, M., Fendler, W., Mlynarski, W.:

Dental Anomalies as Late Adverse Effect among Young Children Treated for Cancer.: *Cancer Res Treat.*, **48**, 658-667, 2016.

- 11) Nagayama J, Tomizawa D, Koh K, Nagatoshi Y, Hotta N, Kishimoto T, Takahashi Y, Kuno T, Sugita K, Sato T, Kato K, Ogawa A, Nakahata T, Mizutani S, Horibe K and Ishii E.: Infants with acute lymphoblastic leukemia and a germline *MLL* gene are highly curable with use of chemotherapy alone: results from the Japan Infant Leukemia Study Group. *Blood.*, **107**, 4663-4665, 2006.
- 12) Mark J., Hickman and Leona D., Samson.: Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*USA., 96, 10764-10769, 1999.
- 13) Kawakami, T., Nakamura, Y., Karibe, H.: Cyclophosphamide-Induced
  Morphological Changes in Dental Root Development of ICR Mice. *PLoS One.*, 10,
  2015.
- 14) Brun-Murdoch, R.A.: The effect of cyclophosphamide on the eruption of impeded and resected incisors in rats., *Archs Oral Biol.*, **35**, 801-806, 1990.
- 15) Nässman, M.N., Hammarströn, L.: Influence of the antineoplastic agent

- cyclophosphamide on dental development in rat molars., *Acta Odontl Scand.*, **54**, 287-294, 1996.
- 16) Gaete, M., Lobos, N., Torres-Quintana, M.A.: Mouse tooth development time sequence determination for the ICR/Jcl strain., *J Oral Sci.*, **46**, 135-41, 2004.
- 17) Miletich, I., Sharpe, P.T.: Normal and abnormal dental development., *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 69-73, 2003.
- 18) Ruch, J.V., Lesot, H., Begue-Kirn, C.: Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.*, **39**, 51-68, 1995.
- 19) Tabata, M.J., Matsumura, T., Liu, J.G., Wakisaka, S., Kurisu, K.: Expression of cytokeratin 14 in ameloblast-lineage cells of the developing tooth of rat, both in vivo and in vitro. *Arch Oral Biol.*, **41**, 1019-27, 1996.
- 20) Kero, D., Kalibovic, Govorko, D., Vukojevic, K., Cubela, M., Soljic, V., Saraga-Babic, M.: Expression of cytokeratin 8, vimentin, syndecan-1 and Ki-67 during human tooth development. *J Mol Histol.*, 45, 627-40, 2014.
- 21) Miwa, Y., Shimada, K., Sunohara, M., Sato, I.: Immunohistochemically localization of vascular endothelial growth factor, vascular endothelial growth

- factor receptor-2, collagen I and fibronectin in the epithelia-mesenchymal junction of the human tooth germ. *Okajimas Folia Anat Jpn.*, **84**, 107-10, 2007.
- 22) Thesleff, I., Stenman, S., Vaheri, A., Timpl, R.: Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Dev Biol.*, **70**, 116-26, 1979.
- 23) Yoshiba, N., Yoshiba, K., Iwaku, M., Nakamura, H., Ozawa, H.: A confocal laser scanning microscopic study of the immunofluorescent localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. *Archives of Oral Biology.*, 39, 395-400, 1994.
- 24) Trowell, O.A.: The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp Cell Res.*, **16**, 118-47, 1959.
- 25) Trowell, O.A.: A modified technique for organ culture in vitro. *Exp Cell Res.*, **6**, 246-8, 1954.
- 26) Ito, T., Ando, T., Suzuki-Karasaki, M., Tokunaga, T., Yoshida, Y., Ochiai, T., Tokuhashi, Y., Suzuki-Karasaki, Y.: Cold PSM, but not TRAIL, triggers autophagic cell death: A therapeutic advantage of PSM over TRAIL. *Int J Oncol.*,

- **53**, 503-514, 2018.
- 27) Chomczynski, P., Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162, 156-9, 1987.
- 28) Layward L, Levinsky R.J, Butler M.: Long-term abnormalities in T and B lymphocyte function in children following treatment for acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* **49**, 251-258, 1981.
- 29) Adatia, A.K.: Cytotoxicity of cyclophosphamide in the rat incisor. *Br J Cancer.*, **32**, 208-218, 1975.
- 30) Anton, E.: Ultrastructural study of the effect of cyclophosphamide on the growth area of incisor teeth of DBA/2 and C 57 BL/6 mice. *Int J Exp Path.*, **77**, 83-88, 1996.
- 31) Satoh, H., Uesugi, Y., Kawabata, T., Mori, K., Fujii, F., Kashimoto, Y., Kajimura, T., Furuhama, K.: Morphological classification of dental lesions induced by various antitumor drugs in mice., *Toxicol Pathol.*, **29**, 292-299, 2001.
- 32) Luan, X., Ito, Y., Diekwish, G.H.: Evolution and Development of Hertwig's

- Epithelial Root Sheath. *Dev Dyn*, **235**, 1167-1180, 2006.
- 33) Thomas, H.F.: Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme., *Arch. Oral Biol.*, **34**, 27-35, 1989.
- 34) Fujiwara, N., Akimoto, T., Otsu, K., Kagiya, T., Ishizeki, K., Harada, H.:

  Reduction of Egf Signaling Decides Transition From Crown to Root in the

  Development of Mouse Molars., *J Exp Zool B Mol Dev Evol.*, **231**, 486-494, 2009.
- 35) Fujiwara, N., Tabata, M, J., Endoh, M., Ishizeki, K., Nawa, T.: Insulin-like growth factor-I stimulates cell proliferation in the outer layer of Hertwig's epithelial root sheath and elongation of the tooth root in mouse molars in vitro., *Cell Tissue Res.*, 320, 69-75, 2005.
- 36) Orban, B.: Oral Histology and Embryology. *Southern Medical Journal.*, **48**, 99, 1955.
- 37) Thesleff, I., Lehtonen, E., Saxen, L.: Basement membrane formation in transfilter tooth culture and its relation to odontoblast differentiation. *Differentiation.*, **10**, 71-79, 1978.

# 表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 小児歯科学分野

(指導:仲野道代教授)

#### 図の説明

- 図1 培養21日目における歯胚の実体顕微鏡像
- (a) シクロフォスファミド製剤非添加群, (b) 0.21 mg/ml 添加群を示す (スケールバー:  $100\,\mu$  m)。

## 図2 本研究のプロトコール

胎生16日齢マウスより下顎第一臼歯の歯胚を実体顕微鏡下で採取し,0.5% アスコルビン酸および 0.5% ペニシリン・ストレプトマイシン含有 BGJb Mediumを用いて 37°C,5% CO<sub>2</sub> 下にて培養を行った。培養 1 日目の歯胚にシクロフォスファミド製剤を、培養液中の濃度が 0.11,0.21,0.42 mg/ml となるように添加した。培養液の交換を隔日で行い,7日間,14日間,21日間のそれぞれの期間,培養した歯胚を実験に供試した。

#### 図3 培養1日目における歯胚の組織像

培養 1 日目におけるシクロフォスファミド製剤非添加群のマウス歯胚のパラフィン切片の HE 染色像を示す (スケールバー:  $200 \, \mu$  m) (a)。(a) の黒線枠内の拡

大像を (b) に示す ( $\blacktriangle$ 内エナメル上皮細胞,  $\triangle$ 外エナメル上皮細胞を示す。 スケールバー:  $50\,\mu$  m)。

EO: エナメル器, DP: 歯乳頭。

図4 シクロフォスファミド製剤による歯胚への組織学的影響

培養 14 日目におけるシクロフォスファミド製剤非添加群および添加群のマウス 歯胚のパラフィン切片の HE 染色像を示す  $(スケールバー: 200 \, \mu \, m)$  (a), (c), (e), (g)。 (a), (c), (e), (g) の黒線枠内の拡大像を (b), (d), (f), (h)に示す ( $\blacktriangle$ 象牙芽細胞,  $\triangle$ エナメル芽細胞を示す。スケールバー:  $50 \, \mu \, m$ )。

培養 21 日目におけるシクロフォスファミド製剤非添加群および添加群のマウス 歯胚のパラフィン切片の HE 染色像を示す (スケールバー:  $200\,\mu$  m) (i), (k), (m), (o)。 (i), (k), (m), (o) の黒線枠内の拡大像を (j), (l), (n), (p)に示す ( $\blacktriangle$ 象牙芽細胞,  $\triangle$ エナメル芽細胞を示す。スケールバー:  $50\,\mu$  m)。

EO: エナメル器, DP: 歯乳頭, AB: エナメル芽細胞, OB: 前象牙芽細胞, D: 象 牙質。 図 5 シクロフォスファミド製剤による歯胚の CK14 およびビメンチン発現への影響 (オールインワン蛍光顕微鏡像)

培養 1 日目におけるシクロフォスファミド製剤非添加群のマウス歯胚のパラフィン切片の蛍光免疫二重染色像を示す ((a): CK14, (b): ビメンチン, (c): 核,

(d): 重ね合わせ。スケールバー: $50 \mu$  m)

培養 14 日目におけるシクロフォスファミド製剤非添加群のマウス歯胚のパラフィン切片の蛍光免疫二重染色像を示す ((e): CK14, (f): ビメンチン, (g): 核, (h): 重ね合わせ。スケールバー:  $50\,\mu$  m)

培養 14 日目におけるシクロフォスファミド製剤 0.21 mg/ml 添加群のマウス歯胚のパラフィン切片の蛍光免疫二重染色像を示す ( (i): CK14 , (j): ビメンチン,  $(k): 核, (l): 重ね合わせ。スケールバー: <math>50 \mu m$ )

培養 21 日目におけるシクロフォスファミド製剤非添加群のマウス歯胚のパラフィン切片の蛍光免疫二重染色像を示す ((m): CK14,(n): ビメンチン,(o): 核,(p): 重ね合わせ。スケールバー:  $50\,\mu$  m)

培養 21 日目におけるシクロフォスファミド製剤 0.21 mg/ml 添加群のマウス歯  $\mathbb{E}$  胚のパラフィン切片の蛍光免疫二重染色像を示す (  $(\mathbf{q}): \mathsf{CK} 14$  ,  $(\mathbf{r}): \mathsf{E} \mathsf{F} \mathsf{F} \mathsf{F}$  ),

(s): 核,(t): 重ね合わせ。スケールバー:  $50 \mu$  m)

図 6 シクロフォスファミド製剤による歯胚の I 型コラーゲンおよびフィブロネクチン発現への影響 (オールインワン蛍光顕微鏡像)

培養 1 日目におけるシクロフォスファミド製剤非添加群のマウス歯胚のパラフィン切片の蛍光免疫二重染色像を示す ((a): I型コラーゲン ,(b): フィブロネクチン,(c): 核,(d): 重ね合わせ。スケールバー:  $50\,\mu$  m)

培養 14 日目におけるシクロフォスファミド製剤非添加群のマウス歯胚のパラフィン切片の蛍光免疫二重染色像を示す ((e): I型コラーゲン ,(f): フィブロネクチン,(g): 核,(h): 重ね合わせ。スケールバー:  $50\,\mu$  m)。

培養 14 日目におけるシクロフォスファミド製剤 0.21 mg/ml 添加群のマウス歯胚のパラフィン切片の蛍光免疫二重染色像を示す ( (i): I型コラーゲン , (j): フィブロネクチン, (k):核, (l): 重ね合わせ。スケールバー  $: 50 \, \mu$  m)。

培養 21 日目におけるシクロフォスファミド製剤非添加群および 0.21 mg/ml 添加群のマウス歯胚のパラフィン切片の蛍光免疫二重染色像を示す (m): I 型コラーゲン ,(n): フィブロネクチン,(o): 核,(p): 重ね合わせ。スケールバー:

 $50 \mu m$ 

培養 21 日目におけるシクロフォスファミド製剤非添加群および 0.21~mg/ml 添加群のマウス歯胚のパラフィン切片の蛍光免疫二重染色像を示す ( (q): I 型コラーゲン , (r): フィブロネクチン , (s): 核 ,  $(t): 重ね合わせ。スケールバー:50 <math>\mu$  m)

図 7 シクロフォスファミド製剤非添加群および添加群における各遺伝子の発現量の比較

(a) CK14, (b) ビメンチン, (c) I 型コラーゲン, (d) フィブロネクチンの遺伝子発現量を, 各日におけるシクロフォスファミド製剤非添加群の遺伝子発現量を基準値とし, 相対比を示す。(Student t 検定 \*P<0.05,\*\*\*P<0.001) (n=3)。



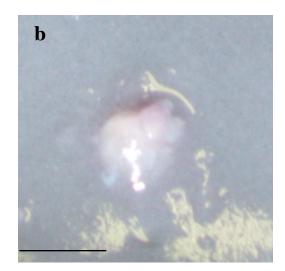


図1. 角田 陽子

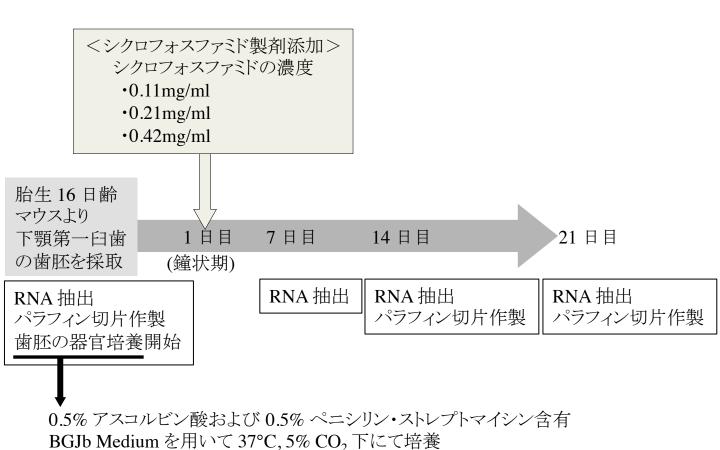
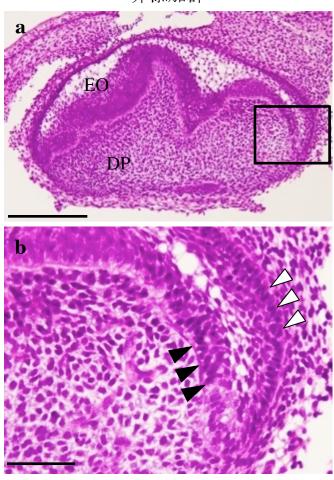


図2. 角田 陽子

1 日目

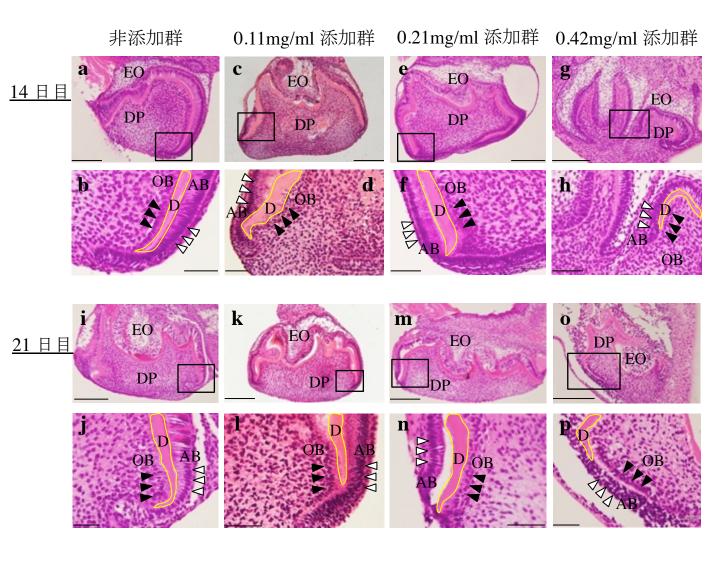
非添加群



▶ 内エナメル上皮細胞

▶ 外エナメル上皮細胞

図3. 角田 陽子



- ▶ 象牙芽細胞
- ▷ エナメル芽細胞

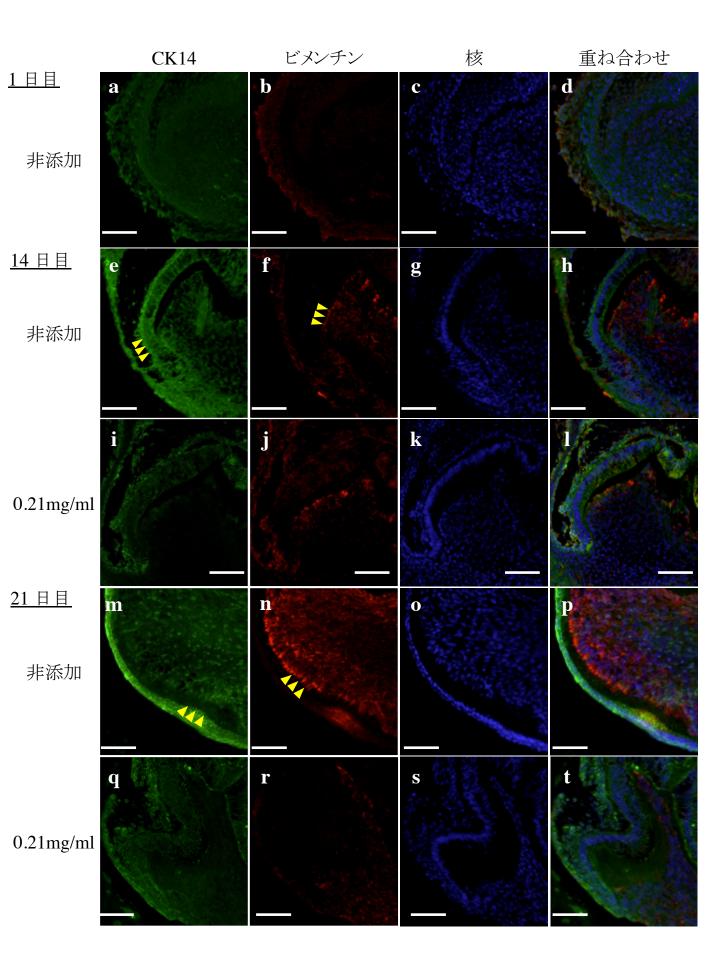
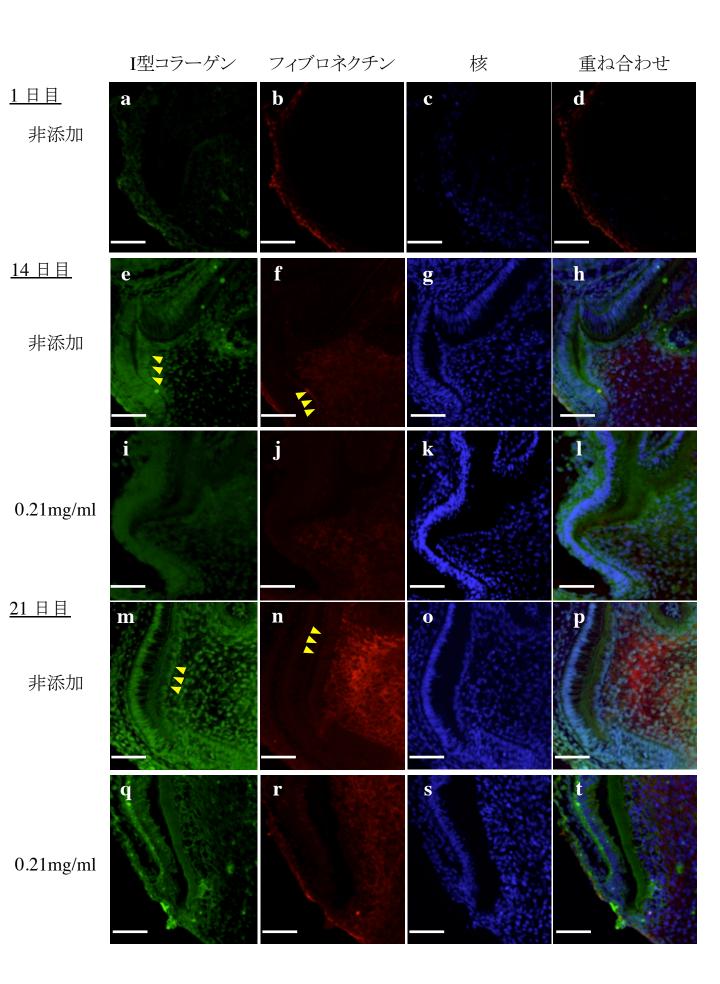


図5. 角田 陽子



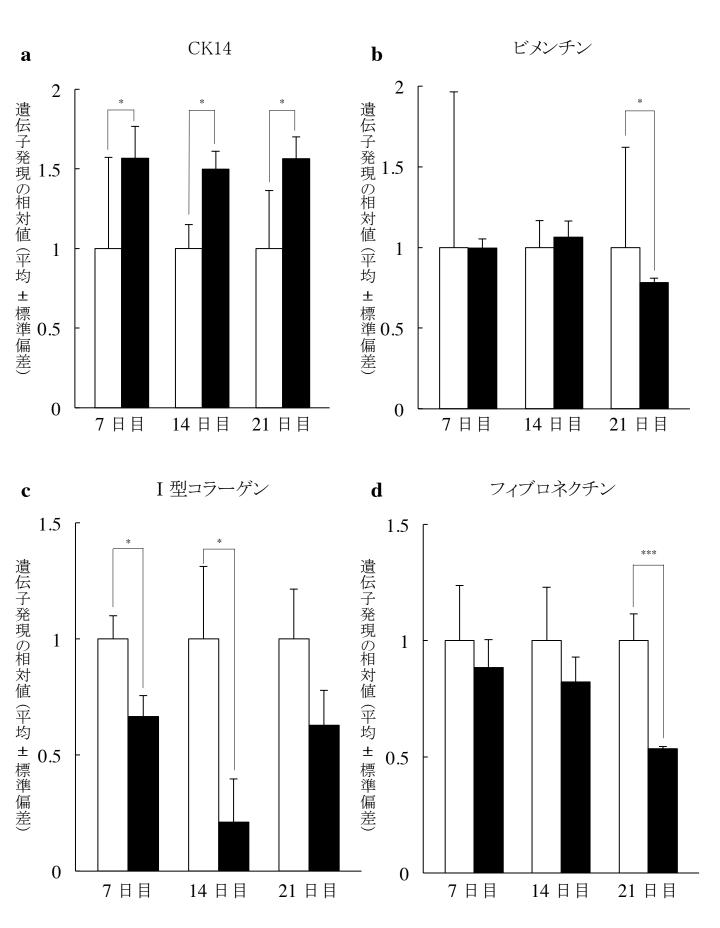


図7. 角田 陽子

# 表1 本研究で使用した抗体

一次抗体	抗体名	希釈率
抗 CK14 抗体	Anti-Cytokeratin 14 antibody, Mouse monoclonal ([LL002], ab7800, Abcam, UK)	1:500
抗ビメンチン抗体	Anti-Vimentin antibody, Rabbit monoclonal ([EPR3776], ab92547, Abcam, UK)	1:20000
抗 I 型コラーゲン抗体	Anti-Collagen I antibody, Mouse monoclonal ([COL-1], ab6308, Abcam, UK)	1:500
抗フィブロネクチン抗体	Anti-Fibronectin antibody, Rabbit monoclonal ([F14], ab45688, Abcam, UK)	1:500

## 表2 本研究で使用したプライマー

名称	塩基配列(5'-3')	増幅産物長(bp)
β-actin/F2	CCCAGCCATGTACGTAGCCATCCAGGCTGT	250
β-actin/R2	GATGTCACGCACGATTTCCCTCTCAGCTGT	
vimentin/756F	TGCTTCTCTGGCACGTCTTG	169
vimentin/925R	GGGCAGCGGTGAGGTCAGGC	
CK14/1111F	GGCCGTTACTGCATGCAGCTGG	199
CK14/1310R	GGGCAGATGAAAGGTGAGCAT	
ColI/F	GGGTCCCTCGACTCCTACA	133
ColI/R	TGTGTGCGATGACGTGCAAT	
Fn/F	GTGGTCATTTCAGATGCGATTCA	125
Fn/R	ATTCCCGAGGCATGTGCAG	