The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on the role of parathyroid hormone-related peptide in tooth development
Author(s)	劉, 継光
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41874
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【2】

氏　　名	劉（りゅう）　継光（けいこう）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　15330　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学基礎系専攻
学位論文名	Studies on the role of parathyroid hormone-related peptide in tooth development （歯の発生における副甲状腺ホルモン関連ペプチドの役割の解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　栗栖浩二郎 （副査） 教　授　雫石　聰　講　師　藤原　卓　講　師　岩本　資己

論文内容の要旨

【研究目的】

副甲状腺ホルモン関連ペプチド（PTHrP）は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の原因物質として初めて単離された。PTHrPとその受容体の遺伝子は胎生組織に広く発現しているが、その機能については殆ど明らかにされていない。ラット胎仔を用いた *in situ* hybridizationによる遺伝子発現の検索では、PTHrP遺伝子は上皮細胞に、PTH／PTHrP受容体遺伝子はその周囲の間葉細胞に発現することが示されている。この所見は、PTHrPが上皮と間葉の相互作用に関与するパラクラインファクターとして機能していることを示唆している。そこで、本研究では、まず、歯胚におけるPTHrP遺伝子とその受容体遺伝子の時間的、空間的、発現パターンを *in situ* hybridization法で検索した。次に、培養マウス歯胚にPTHrPに対するアンチセンスオリゴDNA（AS－ODN）を添加してPTHrP遺伝子の翻訳を特異的に阻害することによって、歯の発生におけるPTHrPの役割を追究した。

【方法】

胎齢16～20日のSprauge-Dawleyラットの下顎より臼歯歯胚を含む組織を摘出して4％パラホルムアルデヒドで固定し、脱灰して凍結切片を作成した。*in situ* hybridizationは、Noji *et al,* の方法（1990）に従った。プローブは、ラットのPTHrP遺伝子とその受容体遺伝子のcDNAより得たリボプローブをDig-UTPで標識して用いた。次に、歯の発生におけるPTHrPの役割を解析するため、胎齢14日のICRマウスより摘出した下顎第1臼歯歯胚の培養系に、PTHrP遺伝子に対するAS－ODNを添加してその効果を検討した。AS－ODNはマウスPTHrP遺伝子の翻訳開始コドンを含むその上流15塩基に対するS－オリゴDNAを用いた。AS－ODNまたはセンスオリゴDNAは、最終濃度が30μMになるように添加し、1日おきに培地とともに交換した。

【結果と考察】

1．ラット歯胚におけるPTHrP遺伝子の発現は、まず蕾状期歯胚の上皮細胞にみられ、帽状期ではエナメル器の内エナメル上皮細胞、星状網細胞、外エナメル上皮細胞およびcervical loopの上皮細胞に広がった。これらの発現の程度は、後期鐘状期では次第に弱くなった。

2．PTHrP受容体の遺伝子発現は、エナメル器は陰性であり、歯乳頭や歯小嚢の間歯及び歯胚周囲の歯槽骨の骨芽細胞に観察された。以上の結果は、PTHrPが歯の発生に深く関与することを示唆する。

3．AS－ODNによるPTHrP遺伝子の翻訳阻害実験では、以下の結果が得られた。胎齢14日のマウスより得た培

養歯胚にAS－ODNを添加した実験では、培養5～6日目より歯乳頭への歯胚周囲の骨組織の侵入が始まり、培養10～17日目ではエナメル器にも骨組織が侵入して、歯胚が分断され、さらに培養を続けると、歯胚は完全に破壊された。しかし、無添加又はセンスオリゴDNAを添加して14日間培養した対照群では、正常な歯胚が形成され、骨組織の歯胚内への侵入は認められなかった。AS－ODNによる歯胚への骨組織の侵入は、組換えPTHrPの同時添加によってレスキューされた。

AS－ODNで処理した試料では、歯胚周囲のTRAP陽性細胞の数が対照群に比べて著しく減少し、電子顕微鏡による観察では刷子縁を持たない不活性な破骨細胞様細胞が歯胚周辺に認められた。以上の結果は、AS－ODN処理によって、破骨細胞の分化と形成が抑制され、歯胚内への骨組織の侵入がおこったことを示唆する。そこで、破骨細胞の分化・形成を特異的に阻害することが知られている、ビタミンK_2又は、ビスフォスフォネートで培養歯胚を8～14日処理したところ、いずれにおいてもAS－ODN処理と同様に歯胚への骨組織の侵入が認められた。これらの結果から、AS－ODN添加による骨組織の歯胚内への侵入は、歯胚周囲の破骨細胞の分化と形成抑制によってもたらされたものであることを強く示唆する。

【結論】

本研究の実験結果から、PTHrPは、歯胚への骨組織の侵入を阻止することによって、顎骨中での正常な歯胚の発生に寄与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、まずラット歯胚における副甲状腺ホルモン関連ペプチド（PTHrP）とその受容体の遺伝子発現パターンを *in situ* hybridization法で検索した。次に、マウス培養歯胚をPTHrPに対するアンチセンスODNで処理して、PTHrP遺伝子の発現を特異的に阻害することによって、歯の発生におけるPTHrPの役割を追究した。その結果、ラット歯胚におけるPTHrP遺伝子は歯胚の上皮細胞に、PTHrP受容体遺伝子は間葉細胞に発現が認められた。また、マウスの培養歯胚をアンチセンスODNで処理した実験では、歯胚内へ周囲の骨組織の侵入が認められた。この骨組織の侵入は、歯胚周囲の破骨細胞の形成と活性化がアンチセンスODNによって阻害されるためであることが、電子顕微鏡による検索や破骨細胞の形成阻害剤を用いた実験で明らかになった。

以上の研究結果から、PTHrPは、破骨細胞の形成と活性化を促すことによって、骨組織の侵入から歯胚を守ることに関与していることが強く示唆された。この所見は歯の発生機構の研究に重要な知見を加えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。