



Title	Studies on the role of parathyroid hormone-related peptide in tooth development
Author(s)	劉, 繼光
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

氏 名	劉 繼 光
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 3 3 0 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。ラット胎子を用いた *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 Sprague-Dawley ラットの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 より得たりボプローブを 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30 μ M 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、歯乳頭や歯小囊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 K₂ 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。