



Title	Role of BMP 4 expressed in the dental mesenchyme of the molar tooth germ of mice
Author(s)	藤井, 隆文
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41876">https://hdl.handle.net/11094/41876</a>
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</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	藤 井 隆 文
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学 位 記 番 号	第 15329 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	Role of BMP 4 expressed in the dental mesenchyme of the molar tooth germ of mice (マウス臼歯歯胚の間葉に発現する Bone morphogenetic protein 4 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 伊集院直邦 助教授 松本 憲 助教授 島内 英俊

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

Bone morphogenetic protein 4 (BMP 4) は、異所性に骨を誘導する骨成長因子として見いだされた。その後の研究で、BMP 4 は骨成長因子としての働きだけではなく、様々な器官の形態形成、特に上皮・間葉相互作用において重要な役割を果たすことが知られている。最近、BMP 4 は歯胚発生の初期には上皮に、帽状期以降は間葉に発現することが示され、特に帽状期では、一時的に現れる上皮細胞の集塊であるエナメル結節に発現することが注目されている。しかし、歯胚の発生過程における BMP 4 の生理的な役割については明らかになっていない。そこで、著者は歯胚の培養系を用い、BMP 4 mRNA に対するアンチセンス・オリゴ (Antisense oligodeoxynucleotide ; AS-ODN) による翻訳阻害実験を行い、歯の形成過程における BMP 4 の役割の解析を試みた。

#### 【方法】

材料は、胎齢13.5日のICRマウスの下顎第一臼歯歯胚を用いた。AS-ODNは、OLIGO (National Biosciences Inc., MN, USA) を用いて設計し、BLASTにてhomology searchを行った。また、無処理のものとrandom sequence-ODNを添加したものを対照群とした。ODNは、ヌクレアーゼ耐性のphosphorothioate修飾したS-oligoで、HPLC精製したものを使用し、培養液に20 μM 添加して、2日毎に培地とともに交換した。歯胚は簡易型Trowell法で培養し、培養液は無血清のBGJb培地にアスコルビン酸100 μg/mlを添加して使用した。培養後の試料は、パラフィン切片を作成しHE染色にて組織学的検索を行った。

また、AS-ODNによるBMP 4 発現の特異的阻害の効果は、RT-PCR法で確かめた。あわせて、AS-ODNと同時に、BMP 4 を強制発現させたCOS 7 細胞の培養上清を培地に添加するレスキューティング実験を行った。また、AS-ODNで5日間処理した歯胚を用いてBrdUの取り込み実験を行い、歯胚細胞の増殖活性を調べた。

#### 【結果】

胎齢13.5日のマウスより摘出した歯胚を、培養下でAS-ODNによって14日間処理すると、以下のような特徴の見られる歯胚が高頻度に認められた。1)歯冠の咬頭形成が阻害されていた。2)内エナメル上皮細胞は、歯冠隣接部域ではエナメル芽細胞への分化が進行していたが、咬合面部域では未分化のままであった。3)歯乳頭の成長抑制が認められた。また、細胞数の減少も認められた。4)象牙芽細胞の分化は、歯冠全域にわたって対照群と大差なく、象牙質の分泌も認められた。

RT-PCR 法による検索では、無添加群と random sequence-ODN 処理群の歯胚では、BMP 4 の発現が確認されたが、AS-ODN 処理群では BMP 4 の発現が認められなかった。これらの結果より、AS-ODN が特異的に BMP 4 の発現を抑制することが確認できた。AS-ODN と同時に、BMP 4 を強制発現させた COS 7 細胞の培養上清を培地に添加したレスキューティー実験では、正常な咬頭形成が認められた。

BrdU の取り込み実験では、次の所見が得られた。無処理歯胚においては、咬合面の咬頭間の溝と隣接部域の内エナメル上皮細胞に強い標識が認められた。一方、AS-ODN 処理歯胚においては、隣接部域の内エナメル上皮の標識は無処理歯胚と同様に強かったが、咬合面のそれは一様で弱かった。エナメル結節と咬頭形成の関係を調べるために、胎齢13.5日の歯胚を3日間培養した。無処理の歯胚ではエナメル結節の形成が明瞭に認められた。しかし、AS-ODN 処理した歯胚では外形に大きな変化はなかったが、全体のサイズがやや小さく、エナメル結節の形成が不明瞭であった。AS-ODN を添加して3日間培養した歯胚を、さらに11日間 AS-ODN 無添加で培養すると咬頭形成の阻害が認められた。

### 【結論】

胎齢13.5日のマウス胎仔より摘出した歯胚を、培養条件下で BMP 4 mRNA に対する AS-ODN で処理したところ、咬頭形成が阻害された。さらに、この AS-ODN による咬頭形成の阻害は、エナメル結節の形成阻害と咬合面部域における内エナメル上皮細胞の分化と増殖異常によるものであることが示唆された。このことより、BMP 4 は、歯胚の発生過程において、咬頭形成に必須な因子であることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、マウス臼歯の培養歯胚を用いて、BMP 4 mRNA に対するアンチセンス・オリゴによる翻訳阻害実験を行い、歯の形成過程における BMP 4 の役割の解析を試みたものである。その結果、エナメル結節の形成阻害と咬合面部域における内エナメル上皮細胞の分化と増殖異常によって咬頭形成が阻害されたことが示唆された。

以上の研究結果は、歯胚の発生過程、特に咬頭形成について重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。