



Title	Cbfa1/Runx2トランスジェニックマウスにおける歯牙形成異常の解析
Author(s)	中村, 玲伊子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43649">https://hdl.handle.net/11094/43649</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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	中村玲伊子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 16949 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	Cbfa1/Runx2トランスジェニックマウスにおける歯牙形成異常の解析
論文審査委員	(主査) 教授 高田 健治  (副査) 教授 祖父江鎮雄    助教授 西村 理行    講師 豊澤 悟

### 論文内容の要旨

#### 【研究目的】

Cbfa1/Runx2は、runt ドメイン遺伝子ファミリーに属する転写因子である。そのノックアウトマウスでは、軟骨による骨格形成は起こるが、膜性骨化も内軟骨性骨化も完全に抑制されており、Cbfa1は骨形成にとって必須の転写因子である事が判明した。すなわち、Cbfa1は未分化間葉系細胞から骨芽細胞系列への分化を誘導し、骨芽細胞で特異的に発現する骨基質を誘導する。また、歯の象牙芽細胞も未分化間葉系細胞から、前象牙芽細胞、形成期象牙芽細胞へと分化し、細胞外基質を産生し、石灰化して象牙質を形成する事から、その分化と基質形成に Cbfa1の関与が考えられる。実際、野生型マウスの歯の初期発生過程において、Cbfa1は歯乳頭の未分化間葉系細胞に発現しており、Cbfa1のノックアウトマウスでは、正常な歯胚の発生は見られず、完全な象牙芽細胞への分化も見られない。また、歯乳頭から分化した象牙芽細胞においても Cbfa1遺伝子の発現が報告されているが、Cbfa1が象牙芽細胞の成熟や象牙質形成にどのような作用を持つかは不明である。そこで、本研究では、I型コラーゲン・プロモーターを用いて、象牙芽細胞の成熟過程で Cbfa1を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、成熟過程にある象牙芽細胞に対する Cbfa1の作用を検討した。

#### 【方法】

##### (1)野生型マウスの歯における Cbfa1遺伝子の発現

Cbfa1 cDNA の3' UT 部分を用いて in situ ハイブリダイゼーションにて、歯における Cbfa1遺伝子の発現部位を確認した。

##### (2)トランスジェニックマウスの作製

I型コラーゲン・プロモーター下に Cbfa1 cDNA を組み込んだ DNA 断片をマウス受精卵に注入し、Cbfa1を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。なお同一プロモーター下に  $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現するマウスも同時に作製し、歯でのトランスジーン発現部位を確認した。遺伝子型はマウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、サザンプロットで判定した。

##### (3)pQCT 分析および組織学的検索

生後6週の野生型および Tg マウスを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、pQCT 分析にて歯の石灰化の程度を野生型と Tg マウスとで比較した。

生後3日、3週の野生型およびTgマウスを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、臼歯と切歯を顎骨ごと摘出した。一晚の浸透固定後に脱灰し、通法にてパラフィン切片を作製し、H.E.染色でTgマウスの歯における形態的な異常について検討した。さらに石灰化基質関連遺伝子の発現はin situハイブリダイゼーションにて、それら各蛋白の分布については免疫染色を用いて、野生型とTgマウスとで比較し、Cbfal過剰発現が象牙芽細胞の分化ならびに基質産生に及ぼす影響を検討した。

#### 【結果】

(1)in situハイブリダイゼーションの結果、野生型マウスでは、広範囲の分化段階の象牙芽細胞にCbfal遺伝子の発現が認められた。

(2)歯でのトランスジーン発現部位を $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現で確認した結果、本研究に用いたI型コラーゲン・プロモーターは象牙芽細胞に特異的に発現することが確認された。

(3)Cbfalトランスジェニックマウスにおける歯の解析

i) 石灰化レベルの解析：全てのTgマウスの切歯は、生後2週頃から破折が認められた。また、pQCT分析の結果、Tgマウスの歯は、野生型に比較して石灰化度の著しい低下が認められた。

ii) 組織学的検討：Tgマウスでは、野生型と比較して象牙質の形成が悪く、象牙前質と象牙質の識別はできず、象牙細管の走行も乱れていた。また、象牙芽細胞はその極性を完全に消失し、その豊富な細胞質は見られず、象牙芽細胞の特徴的な形態は失われていた。また、一部の象牙芽細胞は象牙質内に封入されていた。

iii) in situハイブリダイゼーションおよび免疫組織染色による検討：野生型マウスでは、象牙芽細胞はI型コラーゲン、オステオカルシン、DMP1遺伝子を強く発現しているが、Tgマウスではそれらの発現レベルが明らかに低下していた。また、野生型マウスの象牙芽細胞にオステオポンチン遺伝子の発現は見られないが、Tgマウスではその遺伝子発現が認められた。さらに、免疫染色の結果、Tgマウスの象牙質にはオステオカルシンやDMP1がほとんど認められず、野生型マウスでは本来認められないオステオポンチンが象牙質全域に認められた。

#### 【結論】

Cbfalを過剰発現させた象牙芽細胞では、その細胞極性が完全に失われ、豊富な細胞質が消失し、基質産性能の著明な低下を見た。これは、これらの象牙芽細胞の形質が未熟な分化段階にあることを示している。したがって、Cbfal過剰発現により、未熟な象牙芽細胞様の形質が誘導され、結果として破折を伴う歯の脆弱化がもたらされることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

象牙芽細胞の成熟と基質産生におけるCbfalの関与を、遺伝子工学的手法を応用しin vivoにて検討した。その結果、象牙芽細胞の分化過程後半におけるCbfalの過剰発現は、細胞質の減少と基質産生能の低下で示される未熟象牙芽細胞様の形質を誘導し、結果として破折を伴う歯の脆弱化をもたらすことが明らかとなった。

以上の研究結果は象牙芽細胞の分化過程後半におけるCbfalの関与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。