

Title	歯根形成過程における Dentin Matrix Protein 1(DMP1)遺伝子およびタンパク発現に関する研究
Author(s)	岡林, 久留美
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43676
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	岡 林 久留美 <small>おか ばやし くるみ</small>
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 16927 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	歯根形成過程における Dentin Matrix Protein1 (DMP1) 遺伝子およびタンパク発現に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 伊集院直邦 (副査) 教授 米田 俊之 助教授 脇坂 聡 講師 島袋 善夫

論文内容の要旨

【研究目的】

骨や歯の非コラーゲン性基質である酸性ホスホ蛋白質 (acidic phosphoproteins) は、Asp、Glu、Ser に富み、組織中で負に荷電して Ca^{2+} との結合能を有すると考えられている。近年、酸性ホスホ蛋白質の1つである Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) 遺伝子が、ラット切歯の象牙芽細胞/歯髄の cDNA ライブラリーからクローニングされ、その遺伝子発現は歯や骨組織、および脳組織にも広く認められる事が報告された。その後、骨組織では、DMP1遺伝子は骨芽細胞には発現せず、骨細胞に特異的に発現し、その蛋白は骨細胞周囲の骨基質に局在している事が示された。これにより、これまでに知られている骨基質蛋白は、骨芽細胞で産生されるのに対し、DMP1は骨基質に埋まった骨細胞で特異的に産生されるユニークな基質蛋白である事が示された。一方、歯の象牙質やセメント質形成における DMP1遺伝子の発現パターンについては、これまでに様々な報告があり、その見解の一致は得られていない。

そこで本研究では、形成過程における歯の歯根を用い、象牙質およびセメント質形成における DMP1の遺伝子発現とその蛋白局在を詳細に検討した。

【材料と方法】

1) 材料の採取および標本作製

出生直後から12週齢までの Wistar 系ラット♂を用いた。ネブタール麻酔下、6%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液による灌流固定を施し、上顎第一臼歯 (M1)、および切歯を摘出した。その後、約10日間10%EDTA溶液にて低温脱灰後、パラフィン包埋し、連続切片を作成した。脱パラフィン後、以下の方法で、目的遺伝子発現細胞の同定と蛋白質局在部位の検討を行った。

2) *In situ* hybridization

ラットの全長 DMP1 cDNA を鋳型にして digoxigenin (DIG) -UTP で標識し、*in vitro* 転写で、RNA プローブを作製した。プローブは約150bp にアルカリ加水分解後、hybridization を行い、アルカリホスファターゼ発色にてシグナルを検出した。

3) 免疫染色法

組み換えラット DMP1やラット骨組織脱灰サンプルにてその特異性を示した抗ラット DMP1抗体を用いて、DMP1

の局在を SABC (streptavidin-biotin complex) 法を用いて、免疫組織化学的に検討した。同様に、オステオポンチン (OPN) と Gla 化オステオカルシン (OC) に対する抗体を用いて、それらの蛋白質局在部位と比較検討した。

【結果と考察】

1) 歯根象牙質は、M1では11日齢頃からその形成が開始される。DMP1遺伝子は、歯根象牙質の石灰化開始期以降の象牙芽細胞に認められ、その蛋白質は象牙前質には局在せず、象牙質の象牙細管やその小管に沿って局在していた。その後、12週齢まで歯根象牙質には、同様の DMP1遺伝子発現、および蛋白質局在が観察された。DMP1は分泌性の酸性ホスホ蛋白質であることから、その蛋白質は象牙芽細胞突起周囲の象牙質基質に局在すると考えられる。また、上顎切歯では、無細胞セメント質被覆側象牙質の象牙芽細胞に DMP1遺伝子発現を認め、象牙細管やその小管に沿ってその蛋白質局在が認められたのに対し、エナメル質被覆側象牙質にその遺伝子発現や蛋白質分布は切端部を除いて認められなかった。

象牙質に OPN の局在は認められないが、OC は象牙質全層に局在し、DMP1とは異なる局在パターンを示した。

2-i) 無細胞セメント質は、2週齢の M1のヘルトヴィッヒ上皮鞘の断裂が見られる歯根表面でヘマトキシリン好性の薄層として形成され始める。無細胞セメント質表層には DMP1遺伝子の発現細胞が認められ、その蛋白は無細胞セメント質層に認められた。その後、12週齢まで厚さを増していく無細胞セメント質表層に DMP1遺伝子の発現細胞が認められ、その蛋白は無細胞セメント質全層に局在していた。また、上顎切歯の無細胞セメント質形成においても同様の所見を認めた。これらの歯根表層の DMP1遺伝子発現細胞は、無細胞セメント質層に DMP1蛋白が蓄積していることから、セメント芽細胞であると考えられる。

無細胞セメント質の形成初期には OPN、OC と DMP1は無細胞セメント質に局在が認められた。その後の形成過程では、OPN は無細胞セメント質に淡い免疫反応としてその局在を確認できたが、OC は局在せず、DMP1の局在分布とは異なるパターンを示した。

2-ii) 有細胞セメント質は3週齢の M1の歯根根尖部にその初期形成が観察される。有細胞セメント質では、DMP1遺伝子はその表層のセメント芽細胞に発現せず、セメント質に埋まったセメント細胞に特異的に発現し、その蛋白はセメント細管を含むセメント細胞周囲のセメント質に局在が認められた。その後、12週齢まで歯根下郡で厚さを増していく有細胞セメント質に同様の所見が観察された。これらの DMP1遺伝子発現・蛋白分布パターンは、骨組織におけるパターンとよく類似していた。

有細胞セメント質形成では、OPN は有細胞セメント質に淡い免疫反応としてその局在を確認できたが、OC は象牙質・セメント質境界部を中心に全層に局在し、DMP1とは異なる局在パターンを示した。

【結論】

骨と同様、象牙質およびセメント質においても、DMP1遺伝子は石灰化基質に接した硬組織形成細胞に発現し、その蛋白は石灰化した象牙質や無細胞および有細胞セメント質とそれら細胞の境界に局在するという共通の遺伝子発現・蛋白分布パターンを示す事が明らかになった。以上より、DMP1は、骨と同様に、象牙質およびセメント質形成における石灰化過程に強く関連する事が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は歯根形成における DMP1合成細胞の同定と分泌後の DMP1の局在を *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学的方法を用いて検討したものである。

その結果、歯根象牙質、セメント質では、DMP1遺伝子は石灰化基質に接した象牙芽細胞やセメント芽細胞およびセメント細胞に発現し、その蛋白はそれら細胞に接する石灰化した象牙質や無細胞および有細胞セメント質との境界

部に局在するということが明らかとなった。

以上から、DMP1は基質の石灰化過程に強く関連することが示され、歯や骨の石灰化メカニズムの解明の上で重要な基質蛋白質であることが示された。よって、本研究は博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。