

Title	Hyp マウスにおける象牙質石灰化異常とオステオカルシンとの関連
Author(s)	小川, 智弘
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46399">https://hdl.handle.net/11094/46399</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	小川智弘
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第19931号
学位授与年月日	平成18年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Hypマウスにおける象牙質石灰化異常とオステオカルシンとの関連
論文審査委員	(主査) 教授 大嶋 隆
	(副査) 教授 米田 俊之 助教授 小川 裕三 講師 竹重 文雄

### 論文内容の要旨

#### 〈目的〉

X連鎖性低リン血症性くる病の疾患モデル動物である Hyp マウスは、発育遅延、低リン血症および骨や象牙質の石灰化異常を呈する。Hyp マウスでは、腎尿細管におけるリンの再吸収が障害されている事が知られており、骨や象牙質における石灰化異常がこの再吸収障害による血清リン濃度低下に起因するとされてきた。しかし近年、Hyp マウスの骨芽細胞自身の異常を示唆する報告がなされており、骨形成不全におよぼす血清リン濃度以外の因子の存在が検討されている。オステオカルシン (OC) は骨および象牙質基質タンパク質の一つであり、骨形成に対し抑制的に働いていることが示唆されている。Hyp マウスは血清 OC 濃度が野生型マウスと比較して、高いことが報告されているものの、骨での OC の発現に関しては一致した所見が認められない。本研究においては、1) Hyp マウスにおける象牙質形成不全の原因として象牙芽細胞の異常が存在すること、2) Hyp マウスの象牙芽細胞において OC の発現異常が認められること、3) OC の過剰発現細胞の石灰化能が低下すること、を検討し、Hyp マウスの象牙質石灰化異常と OC の発現異常との関連を考察した。

#### 〈実験方法〉

Hyp マウスとして、ホモ型 Hyp マウス雌および Hyp マウス雄を実験に供した。また、一部の実験には、ヘテロ型 Hyp マウス雌と野生型マウス雄を交配させる事により生まれた正常な遺伝子を有するマウス雄 (Nor マウス) と Hyp マウス雄を供した。

#### 1) Hyp マウスの象牙質石灰化異常に対する血清リン濃度の影響

0、3および20日齢の Hyp、Nor および野生型マウスより血液を採取し、血清リン濃度を測定した。また、摘出した下顎骨から切歯横断切片を作製し、象牙質の形態を観察した。

#### 2) 歯胚における OC の分布

2日齢および6日齢の Hyp および野生型マウスの頭部を摘出、パラフィン切片を作製し、OC mRNA を特異的に認識する RNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法を行った。

#### 3) 歯胚における象牙質基質タンパク質遺伝子発現量

2日齢および6日齢の Hyp および野生型マウスの歯胚と胎生17日齢の Hyp および野生型マウスの歯胚を Trowell 法にて10日間培養した培養歯胚から抽出したトータル RNA を用いて定量的 RT-PCR 法を行い、OC、オステオポンチン、オステオネクチン、I型コラーゲン、DMP-1などの象牙質基質タンパク質 mRNA の発現量を定量した。

#### 4) OCの発現に対するリン濃度の影響

低リン濃度の培地中で培養した野生型マウスの歯胚からトータル RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法により OC mRNA の発現量を定量した。また、0日齢の Hyp、Nor および野生型マウス歯胚からトータル RNA を抽出し、OC mRNA の発現量を定量した。

#### 5) OC 過剰発現が MC3T3-E1 細胞の石灰化に及ぼす影響

OC 遺伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖を挿入したプラスミドを作製し、MC3T3-E1 細胞に作製したプラスミドをトランスフェクションした。これらの細胞が OC の過剰発現および発現抑制されているかを確認し、細胞の石灰化能をアリザリンレッド染色により評価した。

#### 〈結果〉

##### 1) 象牙前質の面積に対する血清リン濃度の影響

0日齢および3日齢の Nor マウスの血清リン濃度は野生型マウスと比べて有意に低かった。しかし、3日齢 Nor マウスの象牙前質の面積は Hyp マウスと比較して有意に小さく、野生型マウスと同程度であった。

##### 2) Hyp マウス歯胚における基質タンパク質遺伝子の発現量

2日齢および6日齢の Hyp マウスの歯胚における OC mRNA の発現量は野生型マウスに比べて有意に多かったが、その他の象牙質基質タンパク質 mRNA の発現量は同等であった。また、歯の形成時において OC mRNA は象牙芽細胞に特異的に分布し、Hyp マウスと野生型マウス間で相違を認めなかった。

##### 3) Hyp マウス歯胚における OC の過剰発現とリン濃度の関係

Hyp マウスの培養歯胚は野生型マウスより OC mRNA を有意に多く発現していた。また、低リン濃度の培地中で培養した野生型マウス歯胚は通常の培地中で培養した歯胚と同程度の OC mRNA 発現量を示した。さらに、出生直後の Hyp マウスは Nor マウスと同程度の血清リン濃度の低下を示していたにもかかわらず、OC mRNA の発現量は Nor マウスに比較して有意に高かった。

##### 4) OC 過剰発現が細胞の石灰化に及ぼす影響

OC を過剰に発現させた MC3T3-E1 細胞はコントロール MC3T3-E1 細胞よりアリザリンレッド陽性面積が有意に増加していた。

以上の結果は、血中リン濃度と関わりなく Hyp マウス象牙芽細胞において OC の発現が増加しており、この OC の増加が象牙質石灰化を低下させている可能性を示している。このことは、Hyp マウスにおける象牙質形成異常には低リン血症などの全身的要因のみならず、OC の発現量の増加といった象牙芽細胞における局所的な異常が関与することを示唆している。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、X連鎖性低リン血症性くる病 (XLH) のモデル動物である Hyp マウスにおける、象牙質石灰化異常と象牙芽細胞におけるオステオカルシンとの関連について検討したものである。その結果、Hyp マウスでは血中リン濃度の低下とは関わりない条件下でも象牙質石灰化異常を示し、その象牙芽細胞においてオステオカルシンの発現増加が認められた。また、オステオカルシンの発現を増加させた骨芽細胞様細胞においては石灰化能の低下が認められ、Hyp マウスの象牙質石灰化異常には低リン血症などの全身的要因のみならず、オステオカルシンの発現量の増加といった象牙芽細胞における局所的な異常が関与することが示唆された。

以上のことから、本研究は、XLH の象牙質石灰化異常の原因を明らかにする上で重要な示唆を与えるものであり、博士 (歯学) の学位授与に値するものと認める。