

Title	エナメル芽細胞の分化におけるdentin sialoproteinの発現
Author(s)	高田, 勇之介
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46404">https://hdl.handle.net/11094/46404</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>〉</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	高田 勇之介
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 20236 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	エナメル芽細胞の分化における dentin sialoprotein の発現
論文審査委員	(主査) 教授 脇坂 聡 (副査) 教授 森崎市治郎 助教授 新谷 誠康 講師 森谷 正之

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

歯の発生は、蕾状期、帽状期、鐘状期と歯胚の形態を変化させながら進行する。その歯胚の変化に伴って、内エナメル上皮細胞は、立方形の細胞から細胞極性を持った細長い円柱状のエナメル芽細胞へと分化し、様々のタンパクを分泌する。その分化機構を解明するためには、分化過程を観察できる細胞培養系の確立と、細胞の分化マーカーが必要である。本研究ではエナメル上皮細胞の分化に伴ったタンパクの分泌に関して、歯の石灰化に重要な役割を果たすと考えられている dentin sialoprotein (DSP) に注目し、DSP に対するモノクローナル抗体を体外免疫法にて作成、その発現とアメロゲンin、アメロプラスチン、低親和性神経成長因子受容体 (p75NGFR) などの既知の分化マーカーの発現とを組織切片と細胞培養系にて比較検討することにより、エナメル上皮細胞の分化マーカーとしての DSP の有用性を模索した。さらに、エナメル上皮細胞の形態的变化についてアメロプラスチン結合領域が存在するといわれているサイトケラチン 14 (CK14) に注目し、CK14 と種々の分化マーカーとの関連についても検索した。

#### 【材料と方法】

**抗 DSP モノクローナル抗体作製** 6 週齢 Balb/c マウスの脾臓に、ブタリコンビナント DSP (1 μg/μl) を注射し、in vivo で抗原感作を行った。注射 2 日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞とミエローマ細胞を細胞融合させた。dot blot および組織染色によるスクリーニングと限界希釈法を用いたクローニングを繰り返し、DSP に対する抗体を産生するハイブリドーマを選択し DeHT-1 と命名した。

**細胞培養** ラット下顎切歯から分離したエナメル上皮細胞株 HAT-7、生後一日の Sprague-Dawley 系ラット下顎切歯歯胚の分泌期エナメル芽細胞を 10% FCS 含有 DMEM Ham F12 で 2 日間培養した。

**ラット組織切片作製** 胎齢 20 日および生後一日のラットの下顎切歯及び第一臼歯の新鮮凍結切片、あるいはパラフィン切片を作製し、免疫化学染色を行った。

**RT-PCR** 生後一日ラットの下顎切歯歯胚、HAT-7 から RNA を抽出し、dspp の RT-PCR を行った。

**Western blot** 生後一日ラットの下顎切歯と臼歯の歯胚、および HAT-7 をサンプルとし、DeHT-1、抗 DSP ポリクローナル抗体を用いて Western blot を行った。

**免疫組織化学染色** ラット組織切片および HAT-7 に対して CK14 抗体 (NOVOCASTRA)、DeHT-1、アメロジェニン抗体 (広島大学 内田先生より供与)、アメロプラスチン抗体 (広島大学 内田先生より供与)、p75NGFR 抗

体 (Chemicon) を用い、間接蛍光法あるいは ABC 法にて免疫染色を行った。

#### 【結果】

**RT-PCR** RT-PCR によりラット歯胚、HAT-7 ともに dspp が発現していることが確認された。

**Western blot** DeHT-1 はラット歯胚、HAT-7 ともに 40 kD と 100 kD 付近のタンパクに強く反応していた。

**免疫組織化学染色** 胎生 20 日の歯胚組織切片において DeHT-1 による特異的な染色は、象牙芽細胞、内エナメル上皮、前エナメル芽細胞、分泌期エナメル芽細胞および中間層細胞の細胞質、歯髄側の象牙前質に認められたが、石灰化前線側の象牙前質、象牙質には認められなかった。p75NGFR は内エナメル上皮細胞にのみ認められ、アメロゲンは内エナメル上皮細胞から前エナメル芽細胞への移行期以降のエナメル芽細胞全体、アメロプラスチンは前エナメル芽細胞からエナメル芽細胞への移行期以降のエナメル芽細胞全体において染色が確認された。また、CK14 は内エナメル上皮細胞の段階で歯乳頭側の細胞膜から徐々にメッシュワークを構築していき、分泌期エナメル芽細胞以降は、細胞内全体にメッシュワーク構造が認められた。

HAT-7 では細胞密度が増加するに伴って一部の細胞が DeHT-1 陽性を示し、これらの細胞の大部分は p75NGFR 陽性であった。一次培養分泌期エナメル芽細胞においても一部の細胞が DeHT-1 陽性であった。

#### 【考察と結論】

dot blot で抗原に反応したことにより、DeHT-1 は DSP を認識していることが分かった。DSP は分子量 52.57 kD の分泌蛋白であるが、過去、電気泳動により、40 kD、100 kD、160 kD など様々検出結果が報告されている。それは、DSP の電荷的が陰性に傾いていること、分泌時の糖鎖修飾、さまざまなスプライジングフォームの存在等に起因すると考えられている。本研究において作成した DSP モノクローナル抗体 DeHT-1 は Western blot で従来報告されている 40 kD と 100 kD のタンパクと強く反応していた。それらは DSP のサブタイプをも認識しているものと思われる。組織染色において DeHT-1 は内エナメル上皮細胞から分泌期エナメル芽細胞に至るまで広範囲の分化段階のエナメル上皮細胞に反応を示した。他の分化マーカーとの併用により、さらに詳細に分化状態を観察できると思われる。また、HAT-7 にも反応を示したことから、細胞培養系においても使用が可能であることが示唆された。

内エナメル上皮細胞からエナメル芽細胞に分化する過程において、細胞はその形態、組織学的特性を変化させてゆく。今回 CK14 で観察したところ、内エナメル上皮細胞から前エナメル芽細胞に形態変化する際に CK14 が特異なメッシュ様構造を呈した。この発現パターンはエナメル上皮細胞の分化過程における DeHT-1 の発現とほぼ同じである。

以上により、DSP、CK14 ともにエナメル上皮細胞に対する分化マーカーとして有用であることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究では、歯の発生過程の分子メカニズムの解明のため、分化マーカーとしての dentin sialoprotein (DSP) の有用性についてモノクローナル抗体を作製して検討した。

その結果、DSP は従来から報告されている間葉組織に加え、エナメル上皮細胞にも認められ、その発現様式はサイトケラチン 14 と関連する可能性が示唆された。

以上の結果は歯の発生機構の一端を明らかにする上で、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。

