



Title	歯根膜形成過程における歯小嚢特異的遺伝子F-spondinの機能的役割の解明
Author(s)	本間, 宏実
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58433">https://hdl.handle.net/11094/58433</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">大阪大学の博士論文について</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

## 論文内容の要旨

### 【研究目的】

歯根膜の発生原基である歯小嚢は、歯原性間葉細胞に由来する前駆体細胞から構成され、歯周組織形成能力を有している。歯根形成期歯胚において、歯小嚢細胞は上皮-間葉相互作用により、骨芽細胞、歯根膜細胞およびセメント芽細胞へと分化し、歯周組織を形成していくと考えられている。しかしながら、歯根膜形成過程における歯小嚢細胞分化の分子メカニズムは、未だ不明な点が多い。これまで我々は、歯根膜形成の起点となる歯小嚢の生物学的分子基盤を明らかにするために、抜去智歯より採取したヒト歯根膜組織を用いて歯根膜発現遺伝子データベースを構築し、機能的クラスタリングと In Situ Hybridization 法によるスクリーニングを行った結果、歯小嚢特異的発現遺伝子として F-spondin を見出した。本研究においては、歯根膜形成過程において歯小嚢特異的に発現する遺伝子 F-spondin のクローニング、および、その機能的役割を検討することにより、歯小嚢から歯周組織が形成される分子メカニズムの解明を試みた。

### 【試料および方法】

#### 1. 歯小嚢特異的遺伝子 F-spondin の発現

胎生期の発生過程における各組織における F-spondin の発現を定量的リアルタイム PCR 法により検討した。次に、胎生 14.5 日齢臼歯歯胚を用いた器官培養において F-spondin の発現の変化をリアルタイム PCR 法により調べた。

#### 2. 初代培養歯原性間葉系細胞 (DMC) の分離・培養

歯根膜細胞への分化能を有する初代培養歯原性間葉系細胞 (DMC) の単離・培養システムの樹立を行った。胎生 14.5 日齢の ICR マウスより臼歯歯胚を採取し、ディスパーゼ処理により歯原性上皮と歯原性間葉組織を分離した後、歯原性間葉組織を通法に従ってコラゲナーゼ処理を行い、歯原性間葉細胞 (DMS) を単離した。

#### 3. 歯根膜細胞分化過程における F-spondin の役割

DMC を用いてアデノウィルスシステムによる過剰発現実験ならびに siRNA によるノックダウン実験を行い、F-spondin が歯根膜細胞分化に及ぼす効果を検討した。歯根膜細胞の分化はペリオスチン、テネイシン N および I 型コラーゲンの発現を指標として評価した。

#### 4. TGF- $\beta$ シグナルに対する作用の検討

まず、TGF- $\beta$ シグナルの伝達分子である Smad3 のリン酸化に対する F-spondin の効果をウェスタンブロットティング法により検討した。次に、Smad 結合領域を 9 回タンデムに配列した領域を融合させたルシフェラーゼレポーターコンストラクトを、FuGene6 を用いて未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞に導入した。24 時

【37】

氏 名	ほん	ま	ひろ	み
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)			
学 位 記 番 号	第	2 4 4 9 4	号	
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日			
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
	歯学研究科分子病態口腔科学専攻			
学 位 論 文 名	歯根膜形成過程における歯小嚢特異的遺伝子 F-spondin の機能的役割の解明			
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 米田 俊之			
	(副査) 教 授 大嶋 隆 准教授 小川 裕三 講 師 前田 隆史			

間後から TGF- $\beta$  (1ng/ml) 存在下および非存在下におけるルシフェラーゼ活性をルミノメーターにより測定した。

#### 5. F-spondin の発現制御

DMC を用いて歯胚形成に関与する Wnt3a、Ihh および TGF- $\beta$ 1 刺激を行い、F-spondin の発現の変化をリアルタイム PCR 法により検討した。

#### 【結果】

1. 歯根膜に発現する遺伝子データベースを構築し、網羅的解析を行った結果、歯小嚢特異的遺伝子として細胞外マトリックス F-spondin をクローニングした。F-spondin は、臼歯歯胚に強く発現し、歯胚形成に伴ってその発現量が増加した。
2. マウス臼歯歯胚より、歯根膜細胞への分化能を保持する歯原性間葉細胞 DMC の分離・培養法を確立した。
3. F-spondin の過剰発現は、DMC における歯根膜の分化マーカーであるペリオスチン、テネイシン N および I 型コラーゲンの発現を抑制した。
4. F-spondin の遺伝子ノックダウンは、ペリオスチン、テネイシン N および I 型コラーゲンの発現を増加させた。
5. F-spondin は TGF- $\beta$ によって誘導される歯根膜細胞分化を抑制した。
6. F-spondin は TGF- $\beta$ 刺激による Smad3 のリン酸化を阻害し、また Smad シグナルを転写レベルでも阻害した。
7. TGF- $\beta$ は DMC における F-spondin の発現を抑制した。

#### 【結論・考察】

本研究結果より、鐘状期の歯小嚢に強く発現する F-spondin は TGF- $\beta$  シグナルを阻害することにより歯根膜細胞分化を抑制し、歯根膜細胞を未分化な状態に保持させることが示唆された。一方、歯根膜の成熟が必要となる部位、時期には F-spondin の発現は低下し、歯根膜細胞の分化を進めると推測される。F-spondin が TGF- $\beta$  シグナルを抑制する分子メカニズムは、TGF- $\beta$  との直接結合による作用と細胞膜タンパク質との結合により活性化される細胞内シグナルを介して間接的に作用する二つ可能性が考えられる。今後、F-spondin のさらに詳細な機能、ならびにその発現制御の解析を進めることにより、歯根膜形成、さらには歯の形成の分子メカニズムの解明が進展すると期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、歯の形成と密接に関連する歯根膜形成の分子メカニズムの解明をめざし、鐘状期の歯小嚢で強く発現する F-Spondin の役割を検討したものである。研究の結果、

F-Spondin は TGF- $\beta$  シグナルを抑制し、歯根膜を未分化な状態に保持する役割を担っていることが明らかとなった。

以上の研究結果は、歯根膜形成の分子基盤に対する理解を深め、また歯の再生療法の開発にも寄与するものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。