



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | リン酸/ピロリン酸の濃度比の変化が歯周組織に及ぼす影響                                                                                                                     |
| Author(s)    | 山元, 有理                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2011, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/58445">https://hdl.handle.net/11094/58445</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

|               |                                                           |          |  |
|---------------|-----------------------------------------------------------|----------|--|
|               |                                                           | 【48】     |  |
| 氏             | 名                                                         | やまもと 有 理 |  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士（歯 学）                                                  |          |  |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 4 5 0 5 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<br>歯学研究科分子病態口腔科学専攻                           |          |  |
| 学 位 論 文 名     | リン酸/ピロリン酸の濃度比の変化が歯周組織に及ぼす影響                               |          |  |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 高田 健治<br>(副査)<br>教 授 豊澤 悟 准教授 北村 正博 講 師 本間 志保 |          |  |

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

リン酸はカルシウムと結合してハイドロキシアパタイトを形成し、ピロリン酸はハイドロキシアパタイトの表面に吸着し石灰化を阻害する。このリン酸とピロリン酸のバランス、すなわちリン酸/ピロリン酸の濃度比により石灰化は調整されている。Plasma cell membrane glycoprotein-1 (PC-1) は、主に骨芽細胞と軟骨細胞の細胞膜および基質小胞に存在し、adenosine triphosphate からピロリン酸を生成する。PC-1 機能不全に陥った *Pc-1* 変異マウスでは、ピロリン酸の減少による、リン酸/ピロリン酸の濃度比の上昇のため、脊椎骨や関節周囲の異常な骨化と関節軟骨の石灰化が認められる。また、歯周組織では臼歯部歯根のセメント質が肥厚するが、その機序は明らかではない。

本研究では、*Pc-1* 変異マウスにおいて、セメント質が肥厚する機序を検討するため、*Pc-1* 変異マウスの歯周組織の形態学的解析と、培養液中にリン酸を添加して、*Pc-1* 変異マウスでのリン酸/ピロリン酸の濃度比の上昇を再現した、培養細胞実験にてセメント質が肥厚す

る機序を検討した。

#### 【材料と方法】

##### 1. *Pc-1* 変異マウスにおける組織学的および免疫組織化学的検討

生後 6 週齢の *Pc-1* 変異マウスの下顎骨を摘出し、前額断で 4  $\mu\text{m}$  厚の切片を作製した。

①ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、臼歯部および切歯部の歯周組織を観察し、セメント質の幅径およびセメント質表層の細胞数を計測した。

②ヤギ抗 PC-1 ポリクローナル抗体、ウサギ抗 Osteopontin (OPN) ポリクローナル抗体およびウサギ抗 Dentin matrix protein 1 (DMP1) ポリクローナル抗体を用いて、*Pc-1* 変異マウスの歯周組織での変化を免疫組織化学的に検討した。

③歯周組織に分布する骨芽細胞とセメント芽細胞を同定するために、ウサギ抗 Sp7/Osterix (Osterix) ポリクローナル抗体を用いた。

④歯周組織に分布する破骨細胞を同定するために、ウサギ抗 Tartrate-resistant Acid Phosphatase (TRACP) ポリクローナル抗体を用いた。

##### 2. *In vitro* でのリン酸/ピロリン酸の濃度比の上昇が歯周組織に及ぼす影響

骨芽細胞には MC3T3-E1 細胞株を用い、セメント芽細胞には OC-CM 細胞株 (D'Errico et al, J. Periodontol, 2000) を用いた。

①細胞増殖能：MC3T3-E1 細胞株と OC-CM 細胞株の培養液中に 1, 3, 5 および 7 mM のリン酸を添加し、細胞数の評価を行った。

②石灰化促進能：MC3T3-E1 細胞株と OC-CM 細胞株の培養液中に 5 mM のリン酸を添加し、アリザリンレッド染色を行った。

③遺伝子発現変化：MC3T3-E1 細胞株と OC-CM 細胞株の培養液中に 1, 3, 5 および 7 mM のリン酸を添加し、濃度依存的な遺伝子発現の変化を検討した。また、5 mM のリン酸を添加し、経時的な遺伝子発現の変化を検討した。

##### 3. 統計学的解析

本研究における統計学的な差の有意性の検討には、Mann-Whitney U test を用いた。

#### 【研究結果】

1. *Pc-1* 変異マウスの歯周組織では、歯根膜腔に著明な変化は認められなかった。しかし、セメント質の幅径は野生型マウスと比較して臼歯部および切歯部で有意に肥厚していた。

2. PC-1 免疫染色では、野生型マウスのセメント質表層のセメント芽細胞層に強い PC-1 の陽性反応が認められ、歯槽骨表層の骨芽細胞層にも PC-1 の陽性反応が認められた。また、硬組織基質の免疫染色では、野生型および *Pc-1* 変異マウスのセメント質には、DMP1 および OPN の発現が認められたが、その発現分布に差異は認められなかった。しかし、歯槽骨表層の OPN の陽性領域幅の増加は、野生型マウスよりも、*Pc-1* 変異マウスにおいて有意に大きかった。

3. *Pc-1* 変異マウスの臼歯部のセメント質表層のセメント芽細胞数は、野生型マウスと比較して、有意に増加していた。

4. 野生型マウスと比較して、*Pc-1* 変異マウスのセメント質表層および歯槽骨表層で、破骨細胞数は有意に増加していた。

5. 骨芽細胞株とセメント芽細胞株でリン酸/ピロリン酸の濃度比が上昇すると、石灰化物形成能は促進したが、細胞増殖能に変化は認められなかった。

6. 骨芽細胞株とセメント芽細胞株でリン酸/ピロリン酸の濃度比が上昇すると、両細胞株で OPN および DMP1 の遺伝子発現量が増加していた。OCN の遺伝子発現量は、セメント芽細胞株で有意に減少していた。

#### 【考察と結論】

PC-1 はその発現分布から、歯槽骨側よりセメント質側でピロリン酸を介して強く石灰化を阻害していると考えられる。そのため、PC-1 機能障害に陥った *Pc-1* 変異マウスでは、その石灰化阻害作用の消失に伴って、歯槽骨側よりセメント質側で石灰化がより促進されると推測される。また、リン酸/ピロリン酸の濃度比が上昇することにより、骨芽細胞株とセメント芽細胞株がともに石灰化基質の遺伝子発現量を上昇させ、両細胞の硬組織形成能が亢進していることが示された。さらに、*Pc-1* 変異マウスでは歯槽骨表層の骨芽細胞数に変化は見られず、セメント質表層のセメント芽細胞数のみに増加が認められた。これらの結果、*Pc-1* 変異マウスの歯周組織を構成するセメント質が肥厚したと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、石灰化を促進するリン酸と石灰化を阻害するピロリン酸のバランス、すなわち、リン酸/ピロリン酸の濃度比の上昇が歯周組織に及ぼす影響について、検討を行ったものである。

*In vivo* 実験では、ピロリン酸を産生する plasma cell membrane glycoprotein-1 (PC-1) の機能不全のため、リン酸/ピロリン酸の濃度比が上昇している *Pc-1* 変異マウスを用いた。*Pc-1* 変異マウスではセメント質が特異的に肥厚することが知られているが、本研究の結果、このセメント質に特異的な肥厚には、ピロリン酸の産生低下やセメント芽細胞数の増加、さらに、歯槽骨における骨吸収亢進が関与していると考えられた。また、*in vitro* 実験では、リン酸/ピロリン酸の濃度比の上昇を再現するため、セメント芽細胞株と骨芽細胞株を用いてリン酸添加実験を行った結果、両細胞株において、石灰化亢進と石灰化関連基質の osteopontin と dentin matrix protein 1 の発現上昇が認められた。

以上の研究結果は、歯周組織におけるセメント質の形成や恒常性維持のメカニズムを解明する上で重要な知見を与えるものである。よって、博士（歯学）の学位取得に値するものと認める。