



Title	象牙質形成におけるFam20Cの役割
Author(s)	浪花, 耕平
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/87950">https://doi.org/10.18910/87950</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

学位論文  
象牙質形成における Fam20C の役割

大阪大学大学院歯学研究科  
口腔科学専攻  
顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第二教室)

浪花 耕平

## 目次

- I. 緒言
- II. 材料と方法
- III. 結果
- IV. 考察
- V. まとめ
- VI. 結語
- VII. 謝辞
- VIII. 参考文献
- IX. 図表



## I . 緒言

骨や歯の生体硬組織は、リン酸カルシウムを主とする無機質と、細胞外基質蛋白質からなる有機質の複合体である。その基質蛋白質の約 90%は I 型コラーゲンであり、硬組織の構造体となるとともに、石灰化沈着の足場として重要な役割を有する<sup>1), 2)</sup>。しかし、同じ I 型コラーゲンでも軟組織に存在するものは石灰化しないため、骨や歯の石灰化には硬組織に特異的に存在する非コラーゲン性蛋白質が重要な役割を担っていると考えられる<sup>3)</sup>。その中でも、small integrin-binding ligand N-Linked glycoproteins (SIBLINGs) family に属する酸性リン蛋白質の osteopontin (OPN)、bone sialoprotein (BSP)、dentin matrix protein 1 (DMP1)、dentin sialophosphoprotein (DSPP) は、硬組織の石灰化部に豊富に含まれていることから、石灰化に密接に関与すると考えられている<sup>4)</sup>。その機序としては、これらの酸性リン蛋白質は、翻訳後修飾過程で高度にリン酸化されることにより、負に荷電して  $\text{Ca}^{2+}$ との強い結合能を獲得し、ハイドロキシアパタイト形成の核となって石灰化に寄与すると考えられている<sup>5), 6)</sup>。蛋白質のリン酸化は無機リン酸の転移反応であり、骨や象牙質から抽出した OPN、BSP、DMP1、DSPP の 1 モル当たりの含有無機リン酸量は、OPN が 13 Pi/mol<sup>7)</sup>、BSP が 5.85 Pi/mol<sup>8)</sup>、DMP1 が 53 Pi/mol<sup>9)</sup>、DSPP の C 端断片である dentin phosphoprotein (DPP)が 209 Pi/mol<sup>10)</sup>であることから、これらの蛋白質は骨や象牙質基質内で高度にリン酸化されている事が分かる。

近年、分泌蛋白質をリン酸化するゴルジ体キナーゼである family with sequence similarity 20, member C (FAM20C)が発見され、モチーフ配列 S-x-E/pS を有する SIBLINGs は FAM20C の基質となり、S-x-E/pS の S 残基がリン酸化される事が報告された<sup>11), 12)</sup>。FAM20C は、全身の臓器に発現が認められ、SIBLINGs 以外にも 100 種類以上の分泌蛋白質をリン酸化し、様々な生物学的プロセスに関与すると考えられているが<sup>13), 14)</sup>、特に骨では骨芽細胞/骨細胞と歯ではエナメル芽

細胞/象牙芽細胞に高い発現が認められる<sup>14)-16)</sup>。ヒトの FAM20C 機能不全疾患である Raine 症候群では、全身骨格の形成異常、低リン血症性くる病、大脳の石灰化等が認められ、その大部分は、肺の低形成による呼吸不全で生後間もなく死に至る<sup>17)</sup>。一方で非致死性症例も報告されており、成人例では永久歯の象牙質やエナメル質にも形成不全が観察される<sup>18)</sup>。FAM20C 機能解析実験によると、全身性の *Fam20C* 欠失マウスでは、低リン血症性くる病とエナメル質/象牙質の形成不全が認められ<sup>19), 20)</sup>、骨芽細胞/象牙芽細胞特異的な *Fam20C* 欠失マウスでは、低リン血症性くる病と象牙質の形成不全が認められる<sup>21), 22)</sup>。また、神経外胚葉組織特異的 *Fam20C* 欠失マウスでは、軽症の低リン血症と顎骨/象牙質の形成不全が生じ<sup>23)</sup>、上皮特異的 *Fam20C* 欠失マウスでは、低リン血症は発症しないがエナメル質形成不全が生じる<sup>24)</sup>。このように FAM20C によるリン酸化は硬組織形成に重要であり、それには全身性の低リン血症が硬組織形成不全に大きく影響していると考えられる。しかし、軽症の低リン血症または無発症状態にある神経外胚葉組織特異的または上皮特異的 *Fam20C* 欠失マウスでも硬組織形成不全が起こるため<sup>23), 24)</sup>、硬組織形成部において FAM20C が重要な役割を担っている事が想定される。そこで、我々は、血中リン濃度が正常値を示す骨芽細胞/象牙芽細胞特異的 *Fam20C* 過剰発現マウス (*Fam20C-Tg*)を用いて、骨形成の局所における FAM20C の役割を検討し、FAM20C は骨基質を含めた分泌蛋白質のリン酸化を亢進し、骨形成を促進すると共に破骨細胞性骨吸収を促進することを以前に報告した<sup>25)</sup>。

DSPP は、象牙質特異的な基質蛋白質であり、象牙質の非コラーゲン性基質蛋白質の中で最も含有量が多い<sup>26)</sup>。また、象牙質には、DSPP が翻訳後修飾過程で切断された N 端断片の dentin sialoprotein (DSP)と、生体内で最も高度にリン酸化された C 端断片の DPP が豊富に含まれることから<sup>26)</sup>、FAM20C によるリン酸化は象牙質形成において重要な生理的意義があると考えられる。しかし、DPP は、構成アミノ酸の約 40%を S (セリン)が占めるにも関わらず、アミノ酸配列内に FAM20C が認識する S-x-E/pS モチーフ配列が殆ど認められない。また、*Fam20C* 欠失または

*Fam20C* ノックダウン歯髄幹細胞を用いた *in vitro* 実験から、FAM20C による象牙芽細胞への分化促進が示唆されているが<sup>27), 28)</sup>、*in vivo* での象牙芽細胞分化における FAM20C の役割は明らかでない。そこで、本研究では、*Fam20C-Tg* を用いて、生体内の象牙質形成部位における FAM20C によるリン酸化の役割を検討した。

## II. 材料と方法

### 1. Fam20C-Tg の DNA コンストラクトと系統維持

DNA コンストラクトは、I 型コラーゲンプロモーター (2.3 kbp) の下流にマウス *Fam20C* cDNA (Gene ID:80752)を挿入して作製した。この DNA コンストラクトを用いた Fam20C-Tg では、骨芽細胞と象牙芽細胞特異的に *Fam20C* を過剰発現する<sup>25)</sup>。Fam20C-Tg は、野生型 C57BL/6 マウス (WT)とのヘテロ交配により維持し、切歯および臼歯を以後の解析に用いた。

なお、本実験は、大阪大学遺伝子組み換え実験安全委員会および大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認下で実施した（承認番号：動歯 29-021、遺伝子組換え実験承認番号：4313）。

### 2. 組織学的解析

#### ① 組織標本の作製

ペントバルビタールナトリウム (200 mg/kg 体重)を腹腔内投与し安楽死させた直後のマウスに対し、左心室から 1000 単位/ml ヘパリン (持田製薬株式会社、東京、日本)を加えた生理食塩水を灌流し、リン酸緩衝 4% パラホルムアルデヒド溶液 (PFA) にて灌流固定を行った後、歯牙を上顎骨ごと採取し、同固定液にて 4°C で一晩浸漬固定した。10% エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム (EDTA/2Na、同仁科学研究所、熊本、日本) 溶液にて、4°C で 2 週間脱灰処理を行った。脱灰終了後、洗浄し、通法に従いパラフィン包埋ブロックを作製した。続いて、パラフィン包埋ブロックより、3 μm 厚に薄切した組織切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン (HE)染色と鍍銀染色、免疫組織化学的染色に用いた。

## ② 鎍銀染色

組織切片を用いて鎍銀染色を行った。通法に従い脱パラフィンを行った後、0.5%プロテイン銀水溶液(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本)を滴下し、37°Cで一晩反応させた。ヒドロキノン・無水硫酸ナトリウム液(富士フィルム和光純薬株式会社)を室温で10分間、1%塩化金水溶液(富士フィルム和光純薬株式会社)を室温で1時間、2%シュウ酸水溶液(富士フィルム和光純薬株式会社)を室温で5分間反応させ、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液(富士フィルム和光純薬株式会社)にて定着させた。水洗後、透徹、封入した<sup>25), 29)</sup>。

## ③ 免疫組織化学的染色

組織切片を用いて免疫組織化学的染色を行った。一次抗体には、ウサギ抗ヒト FAM20C ポリクローナル抗体(200倍希釈、Abcam、Cambridge、U.K.)、マウス抗リン酸化セリン IgG1 抗体(4A4)(1,000倍希釈、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、U.S.A.)、ウサギ抗マウス OPN ポリクローナル抗体(1,000倍希釈、株式会社免疫生物研究所、群馬、日本)、ウサギ抗ラット DMP1 ポリクローナル抗体(1,000倍希釈)<sup>16)</sup>、マウス抗ラット DSP IgG2b κ 抗体(2C12.3)(1,000倍希釈、Sigma-Aldrich)、ウサギ抗ヒト DPP ポリクローナル抗体(20,000倍希釈、Kerafast、Boston、MA、U.S.A.)、マウス抗ヒト RUNX2 IgG2b 抗体(8G5)(1,000倍希釈、株式会社医学生物学研究所、東京、日本)、マウス抗マウス BMP2 IgG2b 抗体(2H6D12)(10,000倍希釈、Elabscience、Houston、TX、U.S.A)を用いた。二次抗体には、ビオチン標識ブタ抗ウサギ IgGs 抗体(300倍希釈、DakoCytomation、Glostrup、Denmark)、ビオチン標識ウサギ抗マウス IgGs 抗体(300倍希釈、DakoCytomation)を用いた。通法に従い脱パラフィン・親水処理を行った組織切片を、0.02%過酸化水素添加メタノール(関東化学株式会社、東京、日本)中に室温で10分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行った。界面活性剤 Tween20(Sigma-Aldrich)を用いた抗原賦活処理の後、非特異的免疫反応を阻

止するために、1%ウシ血清アルブミン (BSA、Sigma-Aldrich)と 0.1%Tween20 (Sigma-Aldrich)を含む TBS (TBS-BSA)を滴下し、室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。次いで、TBS-BSA で希釈した一次抗体を滴下して 4°Cで一晩反応させ、TBS で洗浄後、同じく TBS-BSA で希釈した二次抗体を滴下して室温で 1 時間反応させた。TBS で洗浄後、LSAB (labeled streptavidin biotin)法にてペルオキシダーゼを標識し、3,3'-ジアミノベンジジン (DAB、DakoCytomation) にて免疫反応部位を検出した。水洗後ヘマトキシリンにて対比核染色を行い、脱水、透徹し、封入した。

蛍光抗体法による二重染色は、上記のリン酸化セリンおよび DPP に対する一次抗体を 2 種類混合して滴下した。二次抗体には、Alexa Fluor 488 (緑色)標識ヤギ抗マウス IgG1 (200 倍希釈、Life technologies、Carlsbad、CA、U.S.A.)と Alexa Fluor 594 (赤色)標識ヤギ抗ウサギ IgG1 (200 倍希釈、Life technologies)を用いた。通法に従い脱パラフィン・親水処理を行った切片に対し、前述のごとく抗原賦活化処理を行った。TBS で洗浄後、非特異的免疫反応を阻止するために、TBS-BSA を滴下し、室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。次いで TBS-BSA で希釈した 1 次抗体を滴下し、4°Cで一晩反応させた。TBS で洗浄後、同じく TBS-BSA で希釈した二次抗体を滴下し、4°C で 2 時間反応させた。4',6'-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) (1000 倍希釈、Life technologies)を室温で 3 分間反応させて対比核染色を行った。切片は、褪色防止用封入材 ProLong<sup>®</sup> (Life technologies)で封入した。

#### ④ 象牙質石灰化速度の計測

4 週齢マウスにアリザリン (東京化成工業株式会社、東京、日本)を背部皮下注射し、その 72 時間後にテトラサイクリン塩酸塩 (Sigma-Aldrich)を背部皮下注射した。さらにその 48 時間後に安楽死させたマウスから、歯牙を上顎骨ごと採取し、70%アルコールにて 4°Cで一晩浸漬固定を行った。20μm 厚の非脱灰凍結切片を作製し、上顎第一臼歯歯根の象牙質石灰化速度を測定した。すな

わち、蛍光顕微鏡を用いて、WT と Fm20C-Tg の歯根象牙質において、赤色蛍光を発するアリザリン沈着線と、緑黄色蛍光を発するテトラサイクリン沈着線を写真撮影し、両間隔をイメージ J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.) を用いて計測し、その間隔の 1 日当たりを歯根象牙質の石灰化速度とした。

##### ⑤ 観察、撮影

観察および画像撮影には、Eclipse E600 顕微鏡 (Nikon、東京、日本)、蛍光顕微鏡 Axio Vert. A1 FL (Carl Zeiss、Oberkochen、Germany) を用いた。

### 3. 網羅的リン酸化解析

#### ① 蛋白質抽出とリン酸化ペプチドの濃縮

前述のごとく安樂死させた 4 週齢マウスの上顎第一臼歯を抜去し、歯周組織を除去した後、液体窒素中で凍結粉碎した。抽出液 (4 M グアニジン塩酸塩)/ 0.5 M EDTA (同仁科学研究所)、pH7.4)に入れ、4°Cで 72 時間脱灰抽出を行った。抽出溶液を限外濾過法により濃縮した後、超純水を体積が 200 µl になるよう加えた。続けて 4 倍容のアセトン (富士フィルム和光純薬株式会社)を加え、-30°Cで 16 時間静置した。遠心分離してから上清を除き、沈殿を変性溶液 (8 M 尿素、2 M チオ尿素、100 mM 重炭酸アンモニウム)に再溶解した。溶液の蛋白質濃度を Bradford 法にて測定した後、蛋白質量にして 50 µg 相当を分取し、トリプシンによる加水分解に供した。ジチオトレイルを加え、37°Cで 30 分間静置し、ヨードアセトアミドにより還元アルキル化処理を行った。続けて、20 mM HEPES-NaOH (pH8.0)を加え、溶液の尿素濃度を 2 M まで下げた後、トリプシン 2.5 µg を加え、37°Cで 16 時間静置し、加水分解反応を行った。反応後のペプチド溶液は、脱塩処理を施し、減圧下で乾燥した。Titansphere Phos-TiO Kit (ジーエル サイエンス株式会社、東京、日本) の

取扱説明書に準じ、ペプチド試料からリン酸化ペプチドを濃縮した。マイクロチップに充填した TiO<sub>2</sub>樹脂にリン酸化ペプチドを吸着させた後、強アルカリで溶出した。溶出したペプチド溶液は脱塩処理後、減圧下で乾燥した。

#### ② Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)解析

得られたリン酸化ペプチド試料を、水、アセトニトリルおよびトリフルオロ酢酸からなる溶媒に溶解した。蛋白質量にして 20 µg 相当を、LC-MS/MS に供した。仕様は以下の通り。LC:Ultimate 3000 RSLC nano (Thermo Fisher SCIENTIFIC、Waltham、MA、U.S.A.)。MS/MS:Q Exactive Orbitrap 質量分析計 (Thermo Fisher SCIENTIFIC)。

#### ③ データのピーク整列と配列データベース検索

LC-MS/MS の測定データは、Proteome Discover ver. 2.2 (Thermo Fisher SCIENTIFIC)用いてピーク整列化および配列データベース検索を行った。配列データベースは、UniProt2020\_6 版に登録されている、マウス由来の Swiss-Prot 蛋白質エントリー (計 17,051 件)と The Global Proteome Machine Organization から取得した、ヒト以外の蛋白質汚染物のアミノ酸配列(計 48 件)を組み合わせて構築した。

#### ④ リン酸化ペプチド情報の出力と比較

データベース検索の結果得られた、計 1,685 件のペプチド同定・計量情報のうち、1,545 件 (91.7%)がリン酸化ペプチド情報であった。得られた 1,545 件のリン酸化ペプチドについて、WT と Fam20C-Tg の 2 試料間での比較を行った。各リン酸化ペプチドについて、(Fam20C-Tg 由来のペプチド量/WT 由来のペプチド量)の対数比と検出強度から散布図を作成した。ただし、WT と

Fam20C-Tg のどちらか一方で未検出のペプチドは散布図には記載していない。また OPN、DMP1、DSPP のリン酸化状態について、各蛋白質で検出されたリン酸化部位それぞれのリン酸化率（リン酸化されたアミノ酸残基数/そのアミノ酸残基の総数）を算出し、WT と Fam20C-Tg で比較した。

#### 4. Gene ontology (GO)解析

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 を用いて、GO 解析を行った。Biological process、Molecular function、Cellular component について、P 値の低いものから順に図 2B にまとめた。

#### 5. Micro computed tomography ( $\mu$ CT)解析

前述のごとく安楽死させた 2、4、12、24 週齢マウスから、上顎骨および下顎骨を採取し、70% アルコールにて 4°C で一晩浸漬固定した。その後、 $\mu$ CT 撮影装置 (R\_mCT2、Rigaku、東京、日本、または SKYSCAN1272、BRUKER Japan、神奈川、日本)を用いて、観察および各種形態解析を行った。

#### 6. ウエスタンブロッティング法

前述のごとく安楽死させた 4 週齢マウスの上顎第一臼歯を抜去し、歯周組織を除去した後、液体窒素中で凍結粉碎した。凍結粉碎後、抽出液 (8 M 尿素/EDTA)に入れ、4°C で 72 時間蛋白質を抽出した。抽出した蛋白質は、各濃度の BSA 溶液をスタンダードとして、ドットプロット法にて濃度を測定した。その後、12.5%ポリアクリルアミドゲル(富士フィルム和光純薬株式会社)にて電気泳動し、PVDF 膜 (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社、東京、日本)に転写した。泳動後のゲルは、Coomassie Brilliant Blue (CBB、BIO-RAD、Hercules、CA、U.S.A.)にて染

色し、WT と Fam20C-Tg の抽出液中の総蛋白質量が同程度であることを確認した。一次抗体には、マウス抗ヒト DPP IgG2b 抗体(A-10)(1,000 倍希釈、Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, U.S.A.)を用いた。二次抗体にはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgGs 抗体 (DakoCytomation)を用いた。PVDF 膜は、5%スキムミルク添加 TBS-T にて、室温で 1 時間ブロッキングを行った。抗体の希釈には、0.5%スキムミルク添加 TBS-T を用い、一次抗体は 4°Cで一晩、二次抗体は室温で 1 時間反応させた。各ステップ終了後は TBS-T にて十分に洗浄した。検出には、ImmunoStar® LD (富士フィルム和光純薬株式会社)を用いた。

## 7. 遺伝子発現解析

前述のごとく安樂死させた 4 週齢マウスの上顎第一臼歯を抜去し、歯周組織を除去した後、液体窒素中で凍結粉碎した。凍結粉碎した後、ToriZol Reagent (Thermo Fisher SCIENTIFIC)、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、total RNA を抽出した。ReverTra Ace® qPCR Master Mix (TOYOBO、大阪、日本)を用いて、得られた RNA から cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて、Real-Time PCR 法 (StepOne Real-Time PCR Systems、Thermo Fisher SCIENTIFIC)により、*Fam20c*, *runt-related transcriptional factor 2 (Runx2)*, *osterix (Osx)*, *type 1 collagen (ColI)*, *alkaline phosphatase (Alp)*, *Opn*, *Dmp1*, *Dspp*, *Nestin*, *bone morphologic protein 2 (Bmp2)*遺伝子の発現量を測定した。各遺伝子発現量は、内在性コントロールの *glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*で標準化した。測定に用いたプライマーは表 1 に示した。

## 8. 抜歯実験

3 週齢マウスに対し、三種混合麻酔 (塩酸メドミジン:0.3 mg/kg、ミダゾラム:4 mg/kg、酒石酸ブ

トルファノール:5 mg/kg)を腹腔内投与した後、手術台に固定し、下顎第一臼歯および第二臼歯を抜歯した。8週齢(抜歯後5週間後)で、前述のごとく、マウスを安楽死させた直後に、灌流固定を行い、顎骨を採取した。採取した検体を  $\mu$ CT にて撮影した後、前述のごとく HE 染色標本を作製し、観察した。

## 9. 齒胚の腎被膜下移植実験

生後6日齢マウスより摘出した歯根形成直前の上顎第一臼歯歯胚を、三種混合麻酔下の SCID マウス(C.B-17/Icr-scid/scidJcl、日本クレア株式会社、東京、日本)の腎被膜下に移植した。移植30日後に安楽死させた SCID マウスに、前述のごとく灌流固定を行った後、腎臓ごと歯胚を摘出し、同固定液にて一晩浸漬固定を行った。前述のごとく、3  $\mu$ m 厚の組織切片を作製し、HE 染色と鍍銀染色、免疫組織化学的染色を行った。

## 10. 統計処理

Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, U.S.A.)を用いてスチューデントの t 検定を行い、有意水準は  $P < 0.05$ とした。

### III. 結果

#### 1. Fam20C-Tg の歯における *Fam20C* の発現について

I 型コラーゲンプロモータを用いた Fam20C-Tg<sup>25)</sup> (図 1A) の上顎第一臼歯を主に解析に用いた。4 週齢の上顎第一臼歯における *Fam20C* mRNA 発現は、野生型マウス (WT)と比較して、Fam20C-Tg では、約 30 倍の発現上昇が認められた (図 1B)。1 週齢の上顎第一臼歯における FAM20C 発現は、WT と比較して、Fam20C-Tg では、歯冠象牙芽細胞で増強していた (図 1C, D、黒実線枠:拡大、矢頭:象牙芽細胞)。4 週齢の上顎第一臼歯では、WT と比較して、Fam20C-Tg の歯冠および歯根象牙芽細胞に FAM20C 発現の増強を認めた (図 1E, F 黒実線枠および黒点線枠:拡大、矢頭:象牙芽細胞)。また、歯冠象牙芽細胞における FAM20C 発現は、1 週齢と比較して 4 週齢では、WT と Fam20C-Tg の両者で減弱していた (図 1C-F 黒実線枠:拡大)。

#### 2. 歯の構成蛋白質の網羅的リン酸化解析

FAM20C の過剰発現による歯の構成蛋白質のリン酸化状態を検討するため、4 週齢の上顎第一臼歯より抽出した蛋白質を用いて網羅的リン酸化解析を行った。検出された 1,545 種類のリン酸化ペプチドについての WT と Fam20C-Tg の 2 試料間の計量比較情報から、散布図を作成した (図 2A)。WT と Fam20C-Tg の 2 試料を比較して、5 倍以上多く検出されたリン酸化ペプチドは、Fam20C-Tg で多く認められた (図 2A 青点線より右側に分布する点)。また、WT と比較して Fam20C-Tg で 10 倍以上多く検出されたリン酸化ペプチド、あるいは Fam20C-Tg でのみ検出されたリン酸化ペプチドは、172 種類 (蛋白質の種類としては 90 種)であった。一方、WT と比較して、Fam20C-Tg でその検出量が 10 分の 1 以下であった、あるいは Fam20C-Tg で検出されなかったリン酸化ペプチドは、39 種類 (蛋白質の種類としては 30 種)であった。以上より、象牙芽細胞に過

剩発現した FAM20C は、歯の分泌蛋白質のリン酸化亢進に寄与していることが示された。

Fam20C-Tg でリン酸化が亢進していた蛋白質の機能を調べるために、DAVID を用いて Gene ontology (GO) 解析を行った (図 2B)。その結果、生物学的機能として ossification や biomineral tissue development、osteoblast differentiation、分子機能として calcium ion binding、Insulin-like growth factor binding 等に関与する蛋白質のリン酸化が亢進していることが示された。また、Fam20C はゴルジ領域に存在し分泌蛋白質をリン酸化するキナーゼであり、これらのリン酸化蛋白質は、細胞外あるいは細胞外への分泌経路に局在することが示された。

石灰化に関連する酸性リン蛋白質の OPN や DMP1、DSP (DSPP の N 端断片) のリン酸化ペプチド断片も多く検出された (図 3A、下線: 検出されたアミノ酸配列、黄色および青色背景: 検出されたリン酸化部位、青色背景: WT と比較して Fam20C-Tg で 2 倍以上のリン酸化率を示すリン酸化部位)。Fam20C-Tg 由来の OPN では、計 27 か所 (S:24 か所、T(スレオニン):2 か所、Y(チロシン):1 か所) のリン酸化部位が同定された。そのうち 5 か所の S ( $S^{213}$ 、 $S^{238}$ 、 $S^{243}$ 、 $S^{290}$ 、 $S^{291}$ ) は、WT と比較して Fam20C-Tg でリン酸化が亢進していた (図 3A、OPN 青色背景)。Fam20C-Tg 由来の DMP1 では、計 22 か所 (S:15 か所、T:6 か所、Y:1 か所) のリン酸化部位が同定された。そのうち 6 か所の S と T ( $S^{237}$ 、 $S^{262}$ 、 $S^{266}$ 、 $S^{269}$ 、 $T^{109}$ 、 $T^{285}$ ) は、Fam20C-Tg でリン酸化が亢進、あるいは Fam20C-Tg でのみリン酸化がみられた (図 3A、DMP1 青色背景)。Fam20C-Tg 由来の DSPP の N 端断片である DSP では、計 17 か所 (S:16 か所、T:1 か所) のリン酸化部位が同定された。そのうち 7 か所の S ( $S^{152}$ 、 $S^{163}$ 、 $S^{170}$ 、 $S^{356}$ 、 $S^{387}$ 、 $S^{423}$ 、 $S^{428}$ ) は、Fam20C-Tg でリン酸化が亢進、あるいは Fam20C-Tg でのみリン酸化されていた (図 3A、DSP 青色背景)。WT 由来の OPN、DMP1、DSP では、Fam20C-Tg と比較して、リン酸化が亢進したり、WT でのみリン酸化されていたリン酸化部位はなかった。また、DSPP の C 端断片の DPP は検出されなかった。一方、FAM20C によりリン酸化されることが報告されているエナメル蛋白質 (ENAMELIN、AMELOBLASTIN)<sup>30)</sup> では、WT と

Fam20C-Tg でリン酸化の程度に差はみられず(図に示さず)、象牙芽細胞に過剰発現する FAM20C はエナメル蛋白質のリン酸化に関与しないことが示された。

網羅的リン酸化解析で検出できなかつた DPP は、象牙質の非コラーゲン性蛋白質の構成成分の中で最も多く、高度にリン酸化されてリン酸化セリンを豊富に含むため、リン酸化セリンの免疫組織化学的染色にて<sup>16), 25)</sup>、象牙質におけるリン酸化状態を検討した。4 週齢 Fam20C-Tg の切歯における DPP とリン酸化セリンの蛍光二重染色では、象牙質基質および象牙芽細胞において DPP とリン酸化セリンの共局在が観察された(図 3B)。また Fam20C-Tg の歯冠象牙質では、リン酸化セリンの免疫反応が増強していた(図 3C, C1, D, D1)。以上のことから Fam20C-Tg では、DPP のリン酸化の亢進が示唆された。一方、Fam20C-Tg の歯根象牙質、特に根尖側では、WT と比較して、その免疫反応が減弱しており、リン酸化レベルの低下が示唆された(図 3C3, C4, D3, D4)。なお、歯槽骨のリン酸化セリンの免疫反応は、Fam20C-Tg で増強していた(図 3C2, D2)。

### 3. Fam20C-Tg における象牙質の変化について

上顎第一臼歯の形態学的变化を経時的に μCT にて観察すると上顎第一臼歯の μCT 解析では、WT と比較して、2 週齢から 24 週齢のいずれの週齢においても Fam20C-Tg の歯根象牙質形成量が低下していた(図 4A)。下顎第一臼歯においても歯根象牙質量は低下していた(図に示さず)。μCT 画像の定量解析では、4、12 週齢の上顎第一臼歯の全体量(エナメル質、象牙質、セメント質、歯髄を含む)は、WT と比較して、Fam20C-Tg で減少していたが、エナメル質量に有意差はなかつた(図 4B)。μCT 画像にて歯根象牙質形成の低下が観察されたため、象牙質は歯冠と歯根に分けて解析を行つた。Fam20C-Tg の歯冠の象牙質量は 4 週齢で有意に減少していたものの、12 週齢で WT との有意差は認められず(図 4B)、象牙質密度(象牙質の石灰化密度)は 4 週齢で変化はなく、12 週齢で有意に上昇していた(図 4C)。一方、Fam20C-Tg の歯根長に有意差はないが(図

4B)、歯根の象牙質量および象牙質密度は、4、12 週齢で有意に減少していた (図 4B、C)。12 週齢の上顎第一臼歯の象牙質密度を、高解像  $\mu$ CT (SKYSCAN1272)を用いて詳細に観察すると、Fam20C-Tg では、歯冠から歯頸部にかけて象牙質密度が上昇しており、特にエナメル象牙境やセメントエナメル境付近で象牙質密度の上昇が目立った (図 4D、D1、D2、D4、D5)。一方根尖部付近では、象牙質密度の減少が示唆された (図 4D3、D6)

上顎第一臼歯 (4 週齢)の組織学的解析では、Fam20C-Tg の歯冠部の象牙質や象牙前質の形態に著変は認められなかった (図 5A、B、D、E)。一方、Fam20C-Tg の歯根象牙質の幅は狭くなり、その面積は有意に減少していた (図 5A、C、D、F、G)。また、WT と比較して、Fam20C-Tg の象牙前質の面積や幅、象牙前質面積/象牙質面積は増加し (図 5C、F、G)、歯根象牙質の石灰化速度は有意に減少していた (図 5H)。鍍銀染色では、Fam20C-Tg の歯根象牙質に好銀性の象牙細管構造および象牙細管に垂直に伸びた骨細管様構造が観察された (図 5C'、F'、白矢印)。一方、Fam20C-Tg の歯冠象牙質や WT の歯冠・歯根象牙質には、好銀性の細管構造はみられなかった。

#### 4. Fam20C-Tg における象牙芽細胞の異常について

Fam20C-Tg における象牙質の変化を検討するため、象牙質に特異的で、且つ、象牙質の非コラーゲン性蛋白質の中で最も豊富な DSPP の発現および分布を検討した。DSPP の N 端断片の DSP および C 端断片の DPP の免疫組織化学的染色では、WT と比較して、Fam20C-Tg の象牙質基質や象牙芽細胞で両者の免疫反応は減弱していた (図 6A-D)。特に、Fam20C-Tg の歯根の象牙質と象牙芽細胞では、歯冠と比較して、DSP および DPP 陽性反応は微弱であった (図 6A-D)。4 週齢の上顎第一臼歯の DPP の蛋白定量解析では、WT と比較して、Fam20C-Tg の象牙質では DPP 含有量の減少が認められた (図 6F)。このように、Fam20C-Tg の象牙芽細胞では、DSPP 產生

の低下を含めた機能異常が起きていることが示唆された。

組織学的に象牙芽細胞を検討すると、WT と比較して、Fam20C-Tg の歯冠では変化は明らかでなかったが、歯根では象牙芽細胞の丈が短くなり、WT で観察される高円柱状細胞から立方状細胞へと変化していた（図 7A、矢印）。さらに根尖側の歯根象牙質では、象牙細管構造がなく、細胞封入を伴う異常象牙質が形成されており（図 7B、C）、鍍銀染色で好銀性の骨細管様構造が観察された（図 7B1、C1、矢頭、挿入図：拡大）。一方、WT の歯根象牙質には、細胞封入や骨細管様構造は観察されなかった。FAM20C の発現分布は、異常象牙質の辺縁細胞および封入細胞に認められるとともに、異常象牙質基質にも認められた（図 7B2、C2）。次に、異常象牙質の性質を免疫組織化学的染色にて検討したところ、OPN は、WT では象牙質に陰性（図 7B3）、Fam20C-Tg の異常象牙質では弱陽性を示した（図 7C3）。DMP1 は、WT では象牙細管構造に沿って弱陽性（図 7B4）、Fam20C-Tg の異常象牙質では、びまん性に弱陽性反応を示した（図 7C4）。DSP は、WT では象牙細管構造を中心にびまん性に陽性で（図 7B5）、Fam20C-Tg の異常象牙質では弱陽性であった（図 7C5）。さらに Fam20C-Tg の異常象牙質に接する細胞は、骨芽細胞マーカーである RUNX2 に陽性を示し（図 7D、矢頭）、その周囲の歯髄細胞では、WT と比較して、BMP2 免疫反応の増強していた（図 7D）。上顎第一臼歯の遺伝子発現解析では、WT と比較して、Fam20C-Tg では、*Runx2*、*Alp*、*Opn*、*Dmp1*、*Bmp2* mRNA の発現が有意に上昇した（図 7E）。一方、象牙芽細胞の特異的マーカーである *Dspp* mRNA は Fam20C-Tg で減少傾向はみられるものの有意差はなく（図 7E）、図 6 で示した DSPP 含有量の減少とは異なる結果であった。遺伝子発現と蛋白量は、時に相違があり、蛋白分解時間の関与等が考えられるが、生命現象の理解には遺伝子より蛋白レベルの解析結果が重要であるため、Fam20C-Tg の象牙質における DSPP 蛋白量の減少を重視して以降の解析や考察を進めた。

## 5. Fam20C-Tg の歯根象牙質形成の検討

Fam20C-Tg 歯根における異常象牙質は、咬合開始後の 4 週齢の上顎第一臼歯根尖部に認められたことから、その形成には咬合力が影響しているのではないかと考えた。咬合力が歯根形成に与える影響を排除するため、対合歯である下顎第一および第二臼歯を抜歯して無咬合状態で歯根象牙質形成における FAM20C の役割を検討した。 $\mu$ CT 解析では、Fam20C-Tg の非抜歯マウス群と同様に、抜歯マウス群の抜歯側（右側）でも歯根形成の低下が認められた（図 8A）。組織学的解析では、WT の抜歯マウス群の抜歯側で正常な歯根が形成されているのに対して、Fam20C-Tg の抜歯マウス群の抜歯側では、根尖部に封入細胞のある異常象牙質が認められた（図 8B）。以上より、Fam20C-Tg における根尖部の異常象牙質形成には、咬合力は大きく影響しないことが分かった。

次に、生体における様々な環境要因の影響を排除した状態で、歯根象牙質形成における FAM20C の役割を検討するため、歯根形成直前（生後 6 日齢の WT あるいは Fam20C-Tg）の歯胚を SCID マウスの腎被膜下に移植した。移植 30 日後に歯根が形成された歯胚を腎臓ごと摘出して解析に用いた（図 9A）。生後 6 日齢の WT と Fam20C-Tg 由来の歯胚の発生段階は一致していた（図 9B）。移植 30 日後の WT および Fam20C-Tg 由来の歯胚では歯根様構造が観察され（図 9C \*）、生体と同様に DPP の発現低下が認められた（図 9C）。WT 由来の歯胚の歯根様構造は、象牙細管を認める象牙質様構造を呈していた（図 9D）。一方、Fam20C-T 由来の歯胚の歯根相当部では、象牙細管構造が目立たず、細胞封入を伴う硬組織が形成され、セメント質との境界は不明瞭となっていた（図 9E）。鍍銀染色では、Fam20C-Tg 由来の歯胚の歯根相当部に好銀性の骨細管様構造が確認された（図 9D1、E1 挿入図：拡大）。形成された歯根の性質を検討するため、免疫組織化学的染色を行ったところ、WT 由来の歯胚の歯根象牙質では、OPN は陰性（図 9D2）、DMP1 は弱陽性（図 9D3）、DPP は強陽性であった（図 9D4）。一方、Fam20C-Tg 由来の歯胚の歯

根相当部の硬組織では、OPN、DMP1、DPP の全てに弱陽性を示した（図 9E2-E4）。また、Fam20C-Tg 由来の歯胚の歯根相当部に接して、骨芽細胞マーカーである RUNX2 に陽性の細胞が認められた（図 9F、矢頭）。このように、腎皮膜移植実験でも、Fam20C-Tg の歯根根尖側の異常象牙質と同様の変化が観察されたため、異常象牙質の形成は、FAM20C 過剰発現に起因すると考えられた。

#### IV. 考察

本研究では、Fam20C 欠失実験の報告<sup>19), 22), 23)</sup>から象牙質形成に重要であることが分かった FAM20C を、象牙芽細胞に過剰発現させて、その歯牙の変化から象牙質形成部位における FAM20C の機能について検討した。Fam20C-Tg では、象牙質基質を含む様々な分泌蛋白質のリン酸化が亢進しており、免疫組織化学的手法により象牙質基質のリン酸化は歯冠象牙質では亢進していたが、歯根象牙質の根尖部ではリン酸化の減弱が認められた。また、Fam20C-Tg では、象牙質の主要蛋白質である DSPP 含有量が減少するとともに、歯根象牙質の根尖側では象牙芽細胞分化に異常が認められた。歯冠と歯根の象牙質の定量解析では、その形成量や石灰化レベルに相違がみられたが、これは両者における基質のリン酸化レベルや象牙芽細胞分化の違いに起因すると考えられた。このように、本研究は、象牙質形成における FAM20C によるリン酸化が、象牙質の石灰化と象牙芽細胞の機能・分化を調節する分泌蛋白質の重要な翻訳後修飾であることを示したものである。

網羅的リン酸化解析により、Fam20C-Tg では、WT と比較して、OPN や DMP1、DSP を含めた多くの分泌蛋白質のリン酸化が亢進していた（図 2A、3A）。これらの OPN や DMP1、DSP では、FAM20C のリン酸化モチーフ配列 (S-x-E/pS) に一致しない配列部の S (セリン) や T (スレオニン) のリン酸化も亢進していたが、FAM20C は S-x-E/pS 以外のモチーフ配列を認識することが報告されており<sup>13), 25)</sup>、FAM20C は従来考えられているより多くの基質をリン酸化すると考えられる。生体内で最も高度にリン酸化された DPP は、その殆どが SSD (セリン・セリン・アスパラギン酸) の繰り返し配列から構成され<sup>26)</sup>、S-x-E/pS は数カ所しか認められないが、前述したように SSD の S (セリン) も FAM20C によりリン酸化され、Fam20C-Tg では DPP はさらに高度にリン酸化されている可能性がある。しかしながら、今回の LC-MS/MS を用いた網羅的リン酸化解析では、DPP のペプチド断片

は全く検出されず、Fam20C-Tg における DPP のリン酸化状態は不明であった。この理由として、DPP は SSD の繰り返し配列からなる極めて特殊なアミノ酸配列から構成されており、K (リシン)や R (アルギニン)の C 末端側で切断するトリプシンを用いた断片化処理では、適切な長さのペプチド断片が得られず、LC-MS/MS 解析で検出できなかったと考えられる。本研究で用いた免疫組織化学的手法による基質のリン酸化については、リン酸化セリン特異抗体を用いて、リン蛋白質である DMP1 とリン酸化セリンの免疫反応が共局在することや、骨組織の脱リン酸化処理後にリン酸化セリンの免疫反応が減弱することから妥当な評価が出来る事を以前に報告した<sup>16), 25)</sup>。本研究では、象牙質や象牙芽細胞における DPP とリン酸化セリンの免疫反応は共局在しており、DPP のセリンはリン酸化していることが示された(図 3B)。また、DPP は象牙質の非コラーゲン性蛋白質の中で最も多く、全構成アミノ酸の約 45%がセリンであることを考慮すると<sup>4)</sup>、Fam20C-Tg の歯冠象牙質で増強したリン酸化セリンの免疫反応は(図 3C, C1, D, D1)、DPP のリン酸化亢進を示していると考えられた。

Fam20C-Tg の象牙質において、様々な分泌蛋白質のリン酸化が亢進していたが、象牙質形成におけるその影響は歯冠と歯根象牙質で異なっていた。Fam20C-Tg の歯冠象牙質では大きな変化はみられなかつたが、歯根象牙質では象牙質量や石灰化密度の減少に加えて、象牙質や象牙芽細胞に明らかな形態変化が認められた。特に歯根根尖部では象牙芽細胞分化異常を伴い、骨と象牙質の両特徴を有する異常象牙質が形成された(図 5C'、F'、7B、B1、C、C1 と挿入図)。この歯冠と歯根象牙質に認められた相違は、象牙質の形成と石灰化に重要な DSPP<sup>26), 32), 33)</sup> の歯冠および歯根象牙質における含有量により生じたことが考えられる。すなわち、歯根象牙質では DSPP 含有量が本来から歯冠象牙質の半分程度であるのに加えて<sup>34)</sup>、Fam20C-Tg におけるさらなる DSPP 含有量の減少が、Fam20C-Tg の歯根象牙質の低形成に大きく寄与したと考えられる。象牙質形成に必要な DSPP 用量については、DSPP 欠失マウスに異なる用量の DSPP を発現させた

レスキュー実験が報告されており、象牙質形成には WT の DSPP 含有量の 25%は必要であり、5%では象牙質の部分的回復しかみられない<sup>35)</sup>。Fam20C-Tg の象牙質全体で DSPP 含有量が減少していたものの、歯冠象牙質では DSPP 免疫反応が残存していた(図 6)。また、Fam20C-Tg の冠部象牙質のリン酸化セリンの免疫反応は、WT より増強していたことから(図 3C1、D1)、冠部象牙質では残存 DSPP のリン酸化が亢進していることが示唆される。この残存 DSPP 量が Lim D ら<sup>35)</sup>が報告する WT の 25%程度であれば、Fam20C-Tg の歯冠象牙質では象牙質形成に十分量の残存 DSPP がリン酸化亢進した結果として歯冠象牙質密度の増加が引き起こされたのかも知れない。一方、Fam20C-Tg の歯根象牙質、特に根尖部では、DSPP の免疫反応は WT よりさらに減弱し(図 6)、リン酸化セリンの免疫反応もほぼ消失していることから(図 3B3、C3、B3、C3)、DSPP 量は乏しく、リン酸化レベルも低下して、異常象牙質が形成されたと考えられる。

Fam20C-Tg では、歯冠象牙質や歯冠象牙芽細胞の形態学的变化は明らかではないが、DSPP 発現は減少しているため、歯冠象牙芽細胞にも機能異常が生じている。DSPP 発現制御機構は未だ明らかになっておらず、DMP1 が DSPP 発現促進に直接関与するという報告もあるが<sup>36)</sup>、Fam20C-Tg では *Dmp1* mRNA 発現上昇が認められるが DSPP 発現は減少しているため前述の報告とは一致しない。また、象牙芽細胞に Runx2 が発現すると DSPP 発現は減少するが<sup>37)</sup>、Fam20C-Tg の歯冠象牙芽細胞には Runx2 発現は認められず、FAM20C 過剰発現による DSPP 発現減少の機序は不明である。一方、この DSPP 発現減少は、Fam20C-Tg の象牙芽細胞の分化に重要な影響を及ぼすようである。*Dspp* 遺伝子改変マウス解析から、DSPP の欠失や発現低下により、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化に異常が生じる事が報告されており、DSPP 発現は象牙芽細胞分化に重要と考えられている<sup>35), 38)</sup>。Fam20C-Tg の歯根象牙芽細胞でも DSPP 発現量が減少しており、特に根尖側ではその発現量が乏しくなるため、Fam20C-Tg の歯根では象牙芽細胞分化に異常が生じていると考えられる。実際、Fam20C-Tg の歯根象牙芽細胞は、WT と比較して細胞の丈

が減少しており、歯根根尖部では、立方形から平坦な紡錘形細胞に変化して異常象牙質の表層を被覆し、その基質内に埋入した細胞は骨細管様構造を示す等、象牙芽細胞の形態異常が観察された(図 7A、B、C、8B、9D、E)。また、異常象牙質は OPN、DMP1、DSPP に陽性反応を示し(図 7B、C、8B、9D、E)、異常象牙質を被覆する紡錘形細胞の一部は RUNX2 に陽性反応を示した事から(図 7D、9F)、歯根象牙芽細胞に分化異常が起こっていると考えられる。RUNX2 は骨芽細胞分化に必須であり、間葉系細胞から骨芽細胞系譜細胞への分化方向を決定するとともに、多数の骨・象牙質関連遺伝子を制御している<sup>37), 39), 40)</sup>。象牙質における RUNX2 発現は、象牙芽細胞分化の初期に発現するが、その後の分化・成熟過程でその発現は減少する<sup>41)</sup>。象牙芽細胞に Runx2 を過剰発現させたマウスでは、象牙細管が消失して細胞封入を伴い、好銀性の骨細管様構造が観察される修復象牙質に類似した異常象牙質が歯冠と歯根に形成される<sup>37)</sup>。これらの異常象牙質は、DSPP の免疫反応が減弱する一方で、OPN の免疫反応が陽性となり、さらに Runx2 を過剰発現する立方形から紡錘形の象牙芽細胞に被覆されており<sup>37)</sup>、Fam20C-Tg の歯根根尖部とほぼ同様の現象が生じている。以上から、Fam20C-Tg の歯根象牙質の根尖部で観察された異常象牙質は、象牙芽細胞における RUNX2 発現により生じた変化であると考えられる。修復象牙質の形成時にも OPN や DMP1 発現が上昇し<sup>42)</sup>、RUNX2 陽性細胞がその形成に関わる事から、修復象牙質の形成時には、RUNX2 の上流で FAM20C 発現が上昇している事が推測される。また、根尖部だけではなく、丈が短くなった歯根象牙芽細胞では、免疫染色では検出できない微小なレベルの RUNX2 発現により分化異常が起こっていると思われ、第一臼歯の遺伝子発現解析における *Runx2*、*Alp*、*Opn*、*Dmp1*、*Bmp2*mRNA 発現上昇は、歯根象牙芽細胞の骨芽細胞系譜細胞への分化異常状態を示しているのかも知れない。象牙芽細胞における FAM20C 過剰発現が RUNX2 発現を制御する機序は明らかではないが、Fam20C-Tg の上顎第一臼歯では、*Bmp2*mRNA 発現の上昇や、RUNX2 陽性の歯根象牙芽細胞の歯髄側において、BMP2 の免疫反応が増強した(図 7D、E)こと

から、BMP2 が RUNX2 発現を制御する可能性が推測される。BMP シグナルは、骨や象牙質の発生、骨芽細胞や象牙芽細胞の分化に重要であり、Fam20C 欠失マウスや Fam20C 欠失骨芽細胞/歯髄葉系細胞株では、BMP シグナルが抑制される<sup>28), 43)</sup>。したがって、FAM20C が過剰発現する Fam20C-Tg では、BMP シグナルの亢進を介して象牙芽細胞における Runx2 発現を誘導する可能性が考えられる。

正常マウスの歯の発生過程では、FAM20C は帽状期後期から鐘状期のエナメル上皮に接する歯乳頭細胞に発現し、その後、分化した象牙芽細胞でその発現レベルが増強するが、生後 3 週齢以降は加齢に伴って FAM20C 発現は減少していく、7 週齢でほぼ消失する<sup>15)</sup>。象牙芽細胞への初期分化における FAM20C の役割についての情報は乏しいが、*Fam20C*を欠失またはノックダウンした歯髄幹細胞を用いた *in vitro* 実験では、象牙芽細胞マーカー (DMP1、DSPP) の発現が低下し、石灰化塊形成は抑制されることから<sup>14), 27), 28)</sup>、FAM20C は歯髄幹細胞から象牙芽細胞への初期分化に重要であると考えられる。本研究で用いた Fam20C-Tg では、I 型コラーゲン発現と同調して目的遺伝子が FAM20C を過剰発現するため、象牙芽細胞への分化後の形成期象牙芽細胞 (secretory odontoblast) や成熟期象牙芽細胞 (mature odontoblast) の段階で過剰発現している事になり、FAM20C の持続的で過剰な発現は、後期分化における象牙芽細胞の機能や成熟を妨げると考えられる。正常発生では、歯髄幹細胞から前象牙芽細胞に分化すると、前象牙芽細胞 (pre-odontoblast) は RUNX2 を発現し、その後、象牙芽細胞に分化すると RUNX2 発現が消失することが知られているが<sup>41)</sup>、Fam20C-Tg の歯根根尖部に出現した RUNX2 陽性の異常な象牙芽細胞は、一度、象牙芽細胞へと分化した細胞が、FAM20C の過剰発現によって、未熟な前象牙芽細胞様細胞へと変化したものかも知れない。

## V. まとめ

Fam20C-Tg では、

- ・象牙質基質蛋白質を含む様々な分泌蛋白質のリン酸化が亢進しており、リン酸化が亢進した蛋白質は、硬組織形成や  $\text{Ca}^{2+}$  結合に関与するものが多かった。
- ・歯冠象牙質において、4 週齢でその形成量は低下し、石灰化密度に差はなかったが、12 週齢でその形成量に変化はなく、石灰化密度は亢進した。一方、歯根象牙質では 4 週齢と 12 週齢ともに形成量と石灰化密度が減少した。この相違には象牙質形成に重要な DSPP 産生量の減少と、歯冠象牙質と歯根象牙質が本来含有している DSPP 量の違いが影響すると考えられた。
- ・歯根象牙質に、細胞封入や骨細管様構造が観察され、骨基質蛋白質が混在し、骨と象牙質の両性質を有する異常象牙質が形成された。また、象牙芽細胞の丈は短くなり、立方状から平坦な紡錘形細胞へと変化し、異常象牙質に接して RUNX2 陽性細胞が出現した事から、象牙芽細胞の機能と分化の異常が起こっている事が分かった。

## VI. 結語

FAM20C によるリン酸化は、象牙質の石灰化を促進し、象牙芽細胞の機能と分化を調節するこ  
とが示された。

## VII. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えていただいた大阪大学大学院歯学研究科顎口腔  
病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室）鵜澤成一教授に謹んで感謝の意を表します。また、  
本研究の遂行ならびに論文執筆にあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学  
大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔病理学教室）豊澤悟教授、廣瀬勝俊助教  
に心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、御指導と御協力を賜りました大阪大学  
大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔病理学教室）佐藤淳講師、宇佐美悠講師  
に厚く御礼申し上げます。最後に本研究に対し御協力頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎  
口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室）の諸先生方に心より感謝申し上げます。

## VIII. 参考文献

- 1) 須田立雄、小沢英浩、高橋榮明、新骨の科学 第2版、2016年、医歯薬出版株式会社
- 2) 日本骨代謝学会、骨ペディア 第1版、2015年、羊土社
- 3) Veis A. Mineral-matrix interactions in bone and dentin. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S493-S497.
- 4) Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(3):126–136.
- 5) Gorski JP. Acidic phosphoproteins from bone matrix: a structural rationalization of their role in biomineralization. *Calcif Tissue Int.* 1992;50(5):391–396.
- 6) George A, Veis A. Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chem Rev.* 2008;108(11):4670–4693.
- 7) Prince CW, Oosawa T, Butler WT, et al. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem.* 1987;262(6):2900–2907.
- 8) Salih E. In vivo and in vitro phosphorylation regions of bone sialoprotein. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:223–229.
- 9) Qin C, Brunn JC, Cook RG, et al. Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem.* 2003;278(36):34700–34708.
- 10) Butler WT, Bhowm M, DiMuzio MT, et al. Multiple forms of rat dentin phosphoproteins. *Arch Biochem Biophys.* 1983;225(1):178–186.
- 11) Tagliabuksi VS, Engel JL, Wen J, et al. Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins

- that regulate biominerization. *Science*. 2012;336(6085):1150–1153.
- 12) Ishikawa HO, Xu A, Ogura E, et al. The Raine syndrome protein FAM20C is a Golgi kinase that phosphorylates bio-mineralization proteins. *PLoS One*. 2012;7(8):e42988.
- 13) Tagliabracci VS, Wiley SE, Guo X, et al. A Single Kinase Generates the Majority of the Secreted Phosphoproteome. *Cell*. 2015;161(7):1619–1632.
- 14) Hao J, Narayanan K, Muni T, et al. Dentin matrix protein 4, a novel secretory calcium-binding protein that modulates odontoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2007;282(21):15357–15365.
- 15) Wang X, Hao J, Xie Y, et al. Expression of FAM20C in the osteogenesis and odontogenesis of mouse. *J Histochem Cytochem*. 2010;58(11):957–967.
- 16) Oya K, Ishida K, Nishida T, et al. Immunohistochemical analysis of dentin matrix protein 1 (Dmp1) phosphorylation by Fam20C in bone: implications for the induction of biominerization. *Histochem Cell Biol*. 2017;147(3):341–351.
- 17) Faundes V, Castillo-Taucher S, Gonzalez-Hormazabal P, et al. Raine syndrome: an overview. *Eur J Med Genet*. 2014;57(9):536–542.
- 18) Acevedo AC, Poulter JA, Alves PG, et al. Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations. *BMC Med Genet*. 2015;16:8.
- 19) Wang X, Wang S, Lu Y, et al. FAM20C plays an essential role in the formation of murine teeth. *J Biol Chem*. 2012;287(43):35934–35942.
- 20) Vogel P, Hansen GM, Read RW, et al. Amelogenesis imperfecta and other biominerization defects in Fam20a and Fam20c null mice. *Vet Pathol*. 2012;49(6):998–1017.
- 21) Liu P, Ma S, Zhang H, et al. Specific ablation of mouse Fam20C in cells expressing type I

- collagen leads to skeletal defects and hypophosphatemia. *Sci Rep.* 2017;7(1):3590.
- 22) Liu P, Zhang H, Liu C, et al. Inactivation of Fam20C in cells expressing type I collagen causes periodontal disease in mice. *PLoS One.* 2014;9(12):e114396.
- 23) Wang X, Wang J, Liu Y, et al. The specific role of FAM20C in dentinogenesis. *J Dent Res.* 2015;94(2):330–336.
- 24) Wang X, Jung J, Liu Y, et al. The specific role of FAM20C in amelogenesis. *J Dent Res.* 2013;92(11):995–999.
- 25) Hirose K, Ishimoto T, Usami Y, et al. Overexpression of Fam20C in osteoblast in vivo leads to increased cortical bone formation and osteoclastic bone resorption. *Bone.* 2020;138:115414.
- 26) Prasad M, Butler WT, Qin C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res.* 2010;51(5):404–417.
- 27) Li Q, Yi B, Feng Z, et al. FAM20C could be targeted by TET1 to promote odontoblastic differentiation potential of human dental pulp cells. *Cell Prolif.* 2018;51(2):e12426.
- 28) Liu C, Zhou N, Wang Y, et al. Abrogation of Fam20c altered cell behaviors and BMP signaling of immortalized dental mesenchymal cells. *Exp Cell Res.* 2018;363(2):188–195.
- 29) Hirose S, Li M, Kojima T, et al. A histological assessment on the distribution of the osteocytic lacunar canalicular system using silver staining. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(6):374–382.
- 30) Cui J, Xiao J, Tagliabracci VS, et al. A secretory kinase complex regulates extracellular protein phosphorylation. *Elife.* 2015;4:e06120.
- 31) Xie X, Ma S, Li C, et al. Expression of Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLINGs) in the reparative dentin of rat molars. *Dent Traumatol.* 2014;30(4):285–295.
- 32) Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, et al. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix

- protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*. 2012;57(9):1165–1175.
- 33) Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, et al. Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem*. 2003;278(27):24874–24880.
- 34) Takagi Y, Nagai H, Sasaki S. Difference in noncollagenous matrix composition between crown and root dentin of bovine incisor. *Calcif Tissue Int*. 1988;42(2):97–103.
- 35) Lim D, Wu KC, Lee A, et al. Ritchie HH. DSPP dosage affects tooth development and dentin mineralization. *PLoS One*. 2021;16(5):e0250429.
- 36) Narayanan K, Gajjeraman S, Ramachandran A, et al. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2006;281(28):19064–19071.
- 37) Miyazaki T, Kanatani N, Rokutanda S, et al. Inhibition of the terminal differentiation of odontoblasts and their transdifferentiation into osteoblasts in Runx2 transgenic mice. *Arch Histol Cytol*. 2008;71(2):131–146.
- 38) Guo S, Lim D, Dong Z, et al. Dentin sialophosphoprotein: a regulatory protein for dental pulp stem cell identity and fate. *Stem Cells Dev*. 2014;23(23):2883–2894.
- 39) Chen S, Rani S, Wu Y, et al. Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by Runx2 during odontoblast cytodifferentiation. *J Biol Chem*. 2005;280(33):29717–29727.
- 40) Komori T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. *Mol Cells*. 2020;43(2):168–175.
- 41) Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2.

*Cell Tissue Res.* 2010;339(1):189–195.

- 42) Zhao C, Hosoya A, Kurita H, et al. Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation. *Arch Oral Biol*. 2007;52(10):945–953.
- 43) Liu C, Zhang H, Jani P, et al. FAM20C regulates osteoblast behaviors and intracellular signaling pathways in a cell-autonomous manner. *J Cell Physiol*. 2018;233(4):3476–3486.

表1. Real-time PCR解析用プライマー

Gene symbol	Forward primer	Reverse primer
<i>Fam20C</i>	TGAAGATGATACTGGTGCAGGT	CAACAGCAATGTGCAAAGCGCAAG
<i>Runx2</i>	CTTCGTCAGCATCCTATCAGTTC	TCAGCGTCAACACCACATTG
<i>Osx</i>	CTACCCAGCTCCCTCTCAA	CTTGTACCACGAGGCCATAGG
<i>Col1</i>	CCTGGAATGAAGGGACACCG	CCATCGTTACCGCGAGCACC
<i>Alp</i>	CGCACCGCGATGCAACACCCAC	TGCCCACGGACTTCCCAGCA
<i>Opn</i>	GCAGAATCTCCTTGCACAC	CGAGTCCACAGAATCCTCGC
<i>Dmp1</i>	CGCATCCAATATGAAGACTG	GCTTGACTTTCTTGATGACTCA
<i>Dspp</i>	ATTCCGGTTCCCCAGTTAGTA	CTGTTGCTAGTGGTGCTGTT
<i>Nestin</i>	CCCTGAAGTCGAGGAGCTG	CTGCTGCACCTCTAACGCA
<i>Bmp2</i>	CCCGATCACCTCTCTT	ACCGCAGTCCGTCTAA

*Fam20C* (*family with sequence similarity 20, member C*), *Runx2* (*runt-related transcriptional factor 2*), *Osx* (*osteix*), *Col1* (*type 1 collagen*), *Alp* (*alkaline phosphatase*), *Opn* (*osteopontin*), *Dmp1* (*dentin matrix protein 1*), *Dspp* (*dentin sialophosphoprotein*), *Bmp2* (*bone morphologic protein 2*)

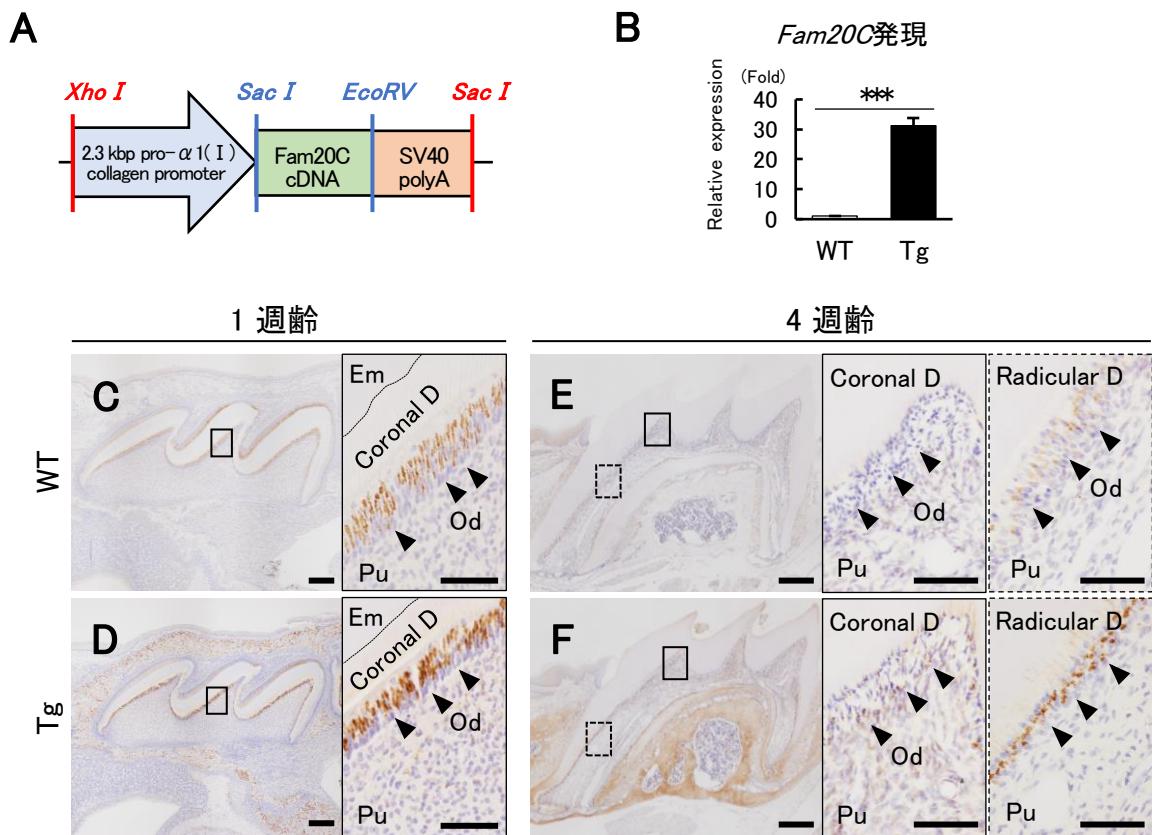


図 1. Fam20C-Tgの歯におけるFam20C発現について

A: Fam20C-TgのDNAコンストラクト

B: 4週齢の上顎第一臼歯におけるFam20C mRNAの発現

上顎第一臼歯 から抽出したcDNAを用いて、Real-Time PCRを行った。グラフは、WTを1とした相対発現量を示す。

WT = 6, Tg = 6, \*\*\*P<0.001。

C-F: 1週齢および4週齢の上顎第一臼歯におけるFAM20C蛋白質の発現

1週齢 (C, D) および4週齢 (E, F) の上顎第一臼歯において、抗Fam20C抗体を用いて、免疫組織化学的染色を行った。

矢頭は象牙芽細胞を示す。黒実線枠は歯冠部拡大、黒点線枠は歯根部拡大を示す。

Em: エナメル質、Coronal D: 歯冠象牙質、Radicular D: 歯根象牙質、Od: 象牙芽細胞、Pu: 齧髄。

スケール: 200 μm、拡大図は50 μm。

WT: 野生型マウス、Tg: Fam20C-Tg。

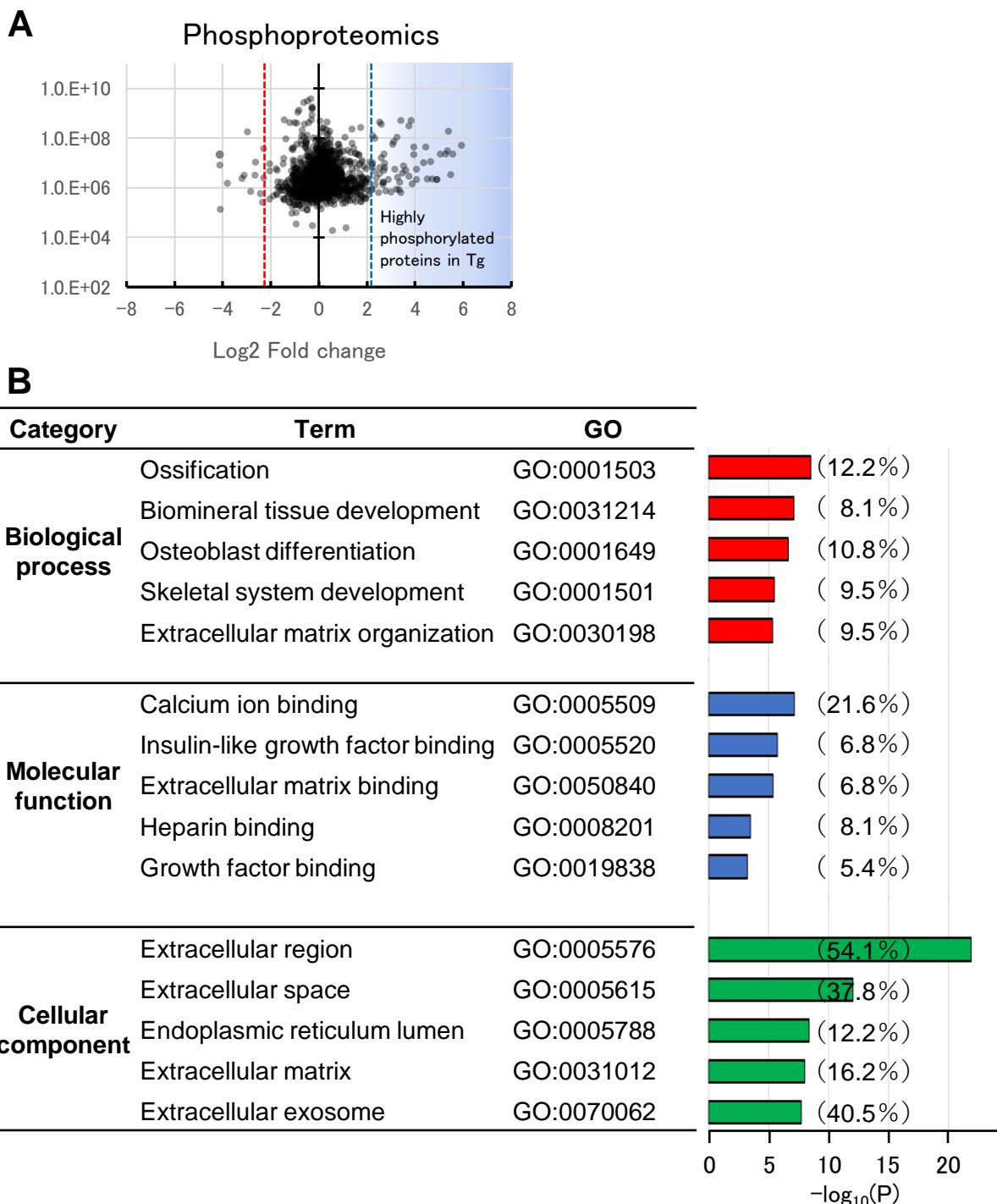


図 2. 網羅的リン酸化解析

**A: リン酸化ペプチドの散布図**

4週齢の上顎第一臼歯から蛋白質を抽出して、リン酸化ペプチドを回収し、LC-MS/MS解析を行った。青点線より右側（青色の領域）に分布する点は、野生型マウス（WT）と比較して、Fam20C-Tg（Tg）では5倍以上多く検出されたリン酸化ペプチドを示す。赤点線より左側に分布する点は、Tgと比較して、WTで5倍以上多く検出されたリン酸化ペプチドを示す。

**B: Gene ontology (GO)解析**

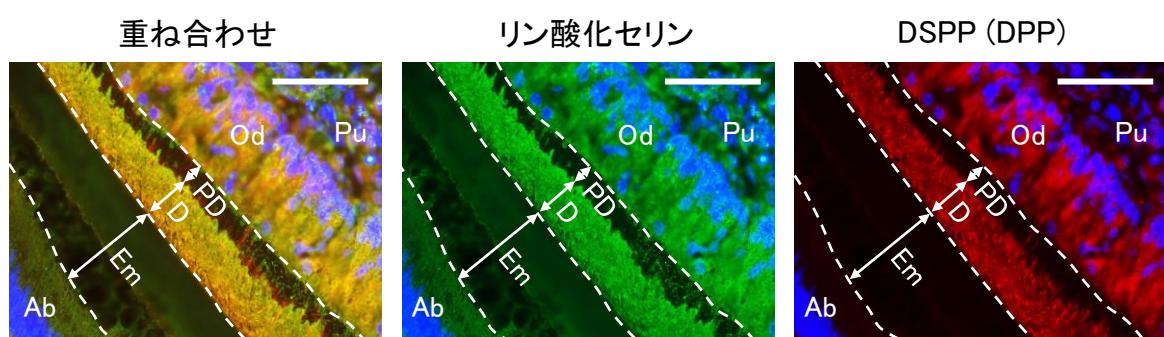
Tgでリン酸化が亢進していた蛋白質のGO解析結果を示す。各棒グラフの長さは $-\log_{10}(P)$ の値であり、P値としては低いものを上から順に示す。また括弧内の数値（%）は、GO解析を行った全蛋白質に対する各Termを含む蛋白質の割合を示す。

**A**

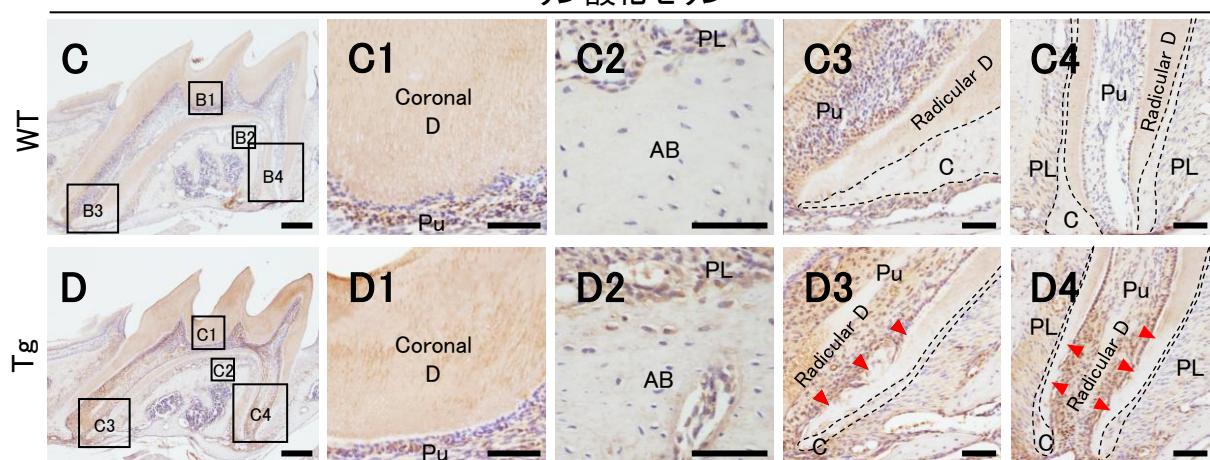
**OPN** 1 mrlavicfc fgiasslpvk vldsgsseek lyslhpdpi a twlvpdpsqk qnllapqnav  
 61 sseekddfkq etlpsnsnes hdhmddd ddddgdhaes eds vds desd eshhsdesde  
 121 tvtastqadt ftipivptvdv pngrgdsay girsksrsfq vsdeqypdat dedltsshmks  
 181 geskesldvi pvaqlsmps dqdnngksh essqldepsl ethrlehske sqesadqsdv  
 241 idsqasskas lehqshkfhs hkdklvldpk skeddrylkf rishelless sevn

**DMP** 1 mktvillvfl wglscalpva ryhntesess eertddlags pppptnsess eesqaspeqq  
 61 ansdhtdsse sgeelgydrg qyrpagglsk stgtgadkdd deddsgddtf gdednglgpe  
 121 egqwgpskl dsdedsdatt qsedstsqe nsaqdtpsds kdqdsedead srpeagdsaq  
 181 dseseeqrvg ggsegesshg dgsefddegm qsddpestrs drgharmssa girseeskgd  
 241 reptstqd dsqsvefssr ksfrsrvse edyrgeltds nsretqsdst edtaskeesr  
 301 sesqedtaes qsqedspeqq dpssesseea gepsqessse sqegvtsser gdnpdntsqt  
 361 gdqedsesse edsintfsss esqsteeqad sesneslsls eesqesaqdg dsssqeglqs  
 421 qsastesrsq esqseqdssrs eedsdqss rskeesnstg sasseedir pknmeadsrk  
 481 livdayhnkp igdqdndcq dgy

**DSP** 1 mkmkiiiyic iwataawaipv pqlvplerdi venvavpli thpgtaaqne lsinstsns  
 61 ndspdgseig eqvlsedgyk rdgngesih vggkdfptqp ilvneqgnta eehndietyg  
 121 hdgvhargen stangirsqv givenaeaae ssvhgqagqn tksggasdvs qngdatlvqe  
 181 neppeasikn stnheagihg sgvathettp qreglgsenq gtevtpsi daglddtdgs  
 241 psgngveede dtgsgdgega eadgreshd gtkgqggqsh ggntdhrgqs svsteddsk  
 301 eqegfpnghn gdnsseengv eegdstqatq dnqklspkdt rdaeggiisq seacpsgksq  
 361 dqgitegpn kgnksiitke sgklsgskds nhgqgveldk rnspkqgesd kpqgtaeka  
 421 ahsnighsri gssnsdghd syefddesmq g

**B**

リン酸化セリン



### 図3. 象牙質のリン酸化状態の検討

#### A:OPN、DMP1、DSPPのリン酸化状態

網羅的リン酸化解析により検出されたOPN、DMP1、DSPのアミノ酸配列（下線）の中で、同定されたリン酸化部位は黄色と青色の背景で示す。青色背景は、WT由来のペプチドと比較して、Tg由来のペプチドでリン酸化率が2倍以上高い部位を示している。例えば、OPNのSer<sup>213</sup>のリン酸化率は、WTとTgの各々で、リン酸化されたSer<sup>213</sup>の数/Ser<sup>213</sup>の総数として算出する。WTのSer<sup>213</sup>のリン酸化率は6%、Tgではリン酸化率が20%と算出され、WTと比較して、Tg由来のOPNのSer<sup>213</sup>では3倍以上のリン酸化率を示すことになる。

#### B:4週齢の上顎切歯におけるリン酸化セリンおよびDPPの分布

上顎切歯において、抗リン酸化セリン抗体および抗DPP抗体を用いて、蛍光二重染色を行った。

左は重ね合わせ像で、中央はリン酸化セリン、右はDPPを示す。

Pu:歯髄、Od:象牙芽細胞、PD:象牙前質、D:象牙質、Em:エナメル質、Ab:エナメル芽細胞。

スケール:50μm。

#### C、D:4週齢の上顎第一臼歯におけるリン酸化セリンの分布

上顎第一臼歯において、抗リン酸化セリン抗体を用いて、免疫組織化学的染色を行った。

B1-B4およびC1-C4は、BおよびCの黒実線枠の拡大で、C1およびD1は歯冠部、C2およびD2は歯槽骨、C3およびD3は近心根根尖部、C4およびD4は遠心根根尖部を示す。

D3、D4 赤矢頭は免疫反応が減弱している部分を示す。

Coronal D:歯冠象牙質、Radicular D:歯根象牙質、Pu:歯髄、AB:歯槽骨、PL:歯根膜、C:セメント質。

スケール:B、Cは200 μm、B1-B4、C1-C4は50 μm。

WT:野生型マウス、Tg:Fam20C-Tg。

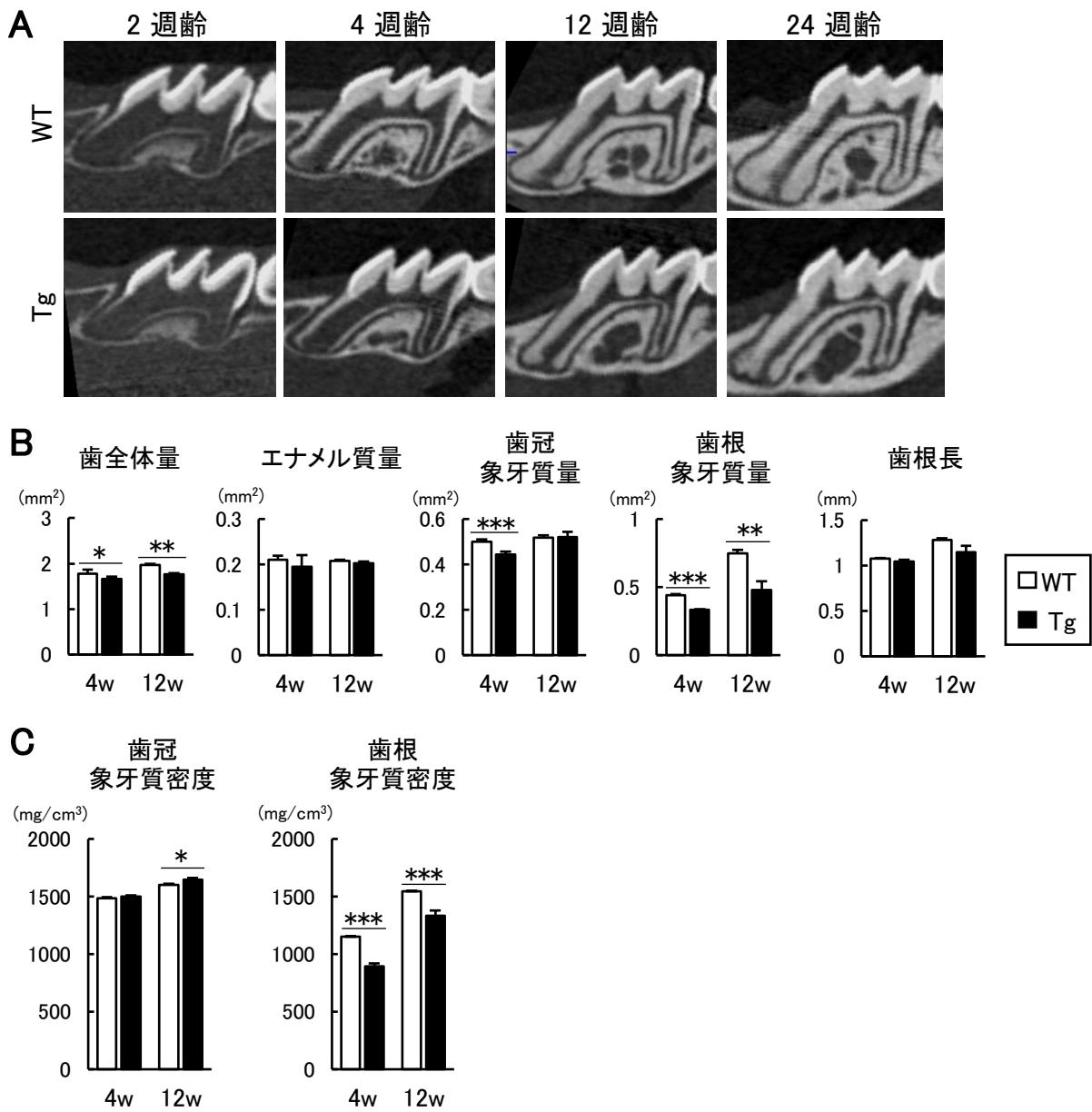


図 4. Micro computed tomography ( $\mu$ CT) 解析

**A: 2、4、12、24週齢の上顎第一臼歯 の $\mu$ CT画像**

各週齢の上顎第一臼歯の矢状断 $\mu$ CT画像を示す。いずれの週齢においても、歯根象牙質の形成量が低下していた。

**B、C: 4、12週齢の上顎第一臼歯 の $\mu$ CT解析**

$\mu$ CT画像データをもとに各解析を行った。歯の全体量は、エナメル質、象牙質、セメント質、歯髄腔を含む。

WT = 6、Tg = 6、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 。

WT: 野生型マウス、Tg: Fam20C-Tg。

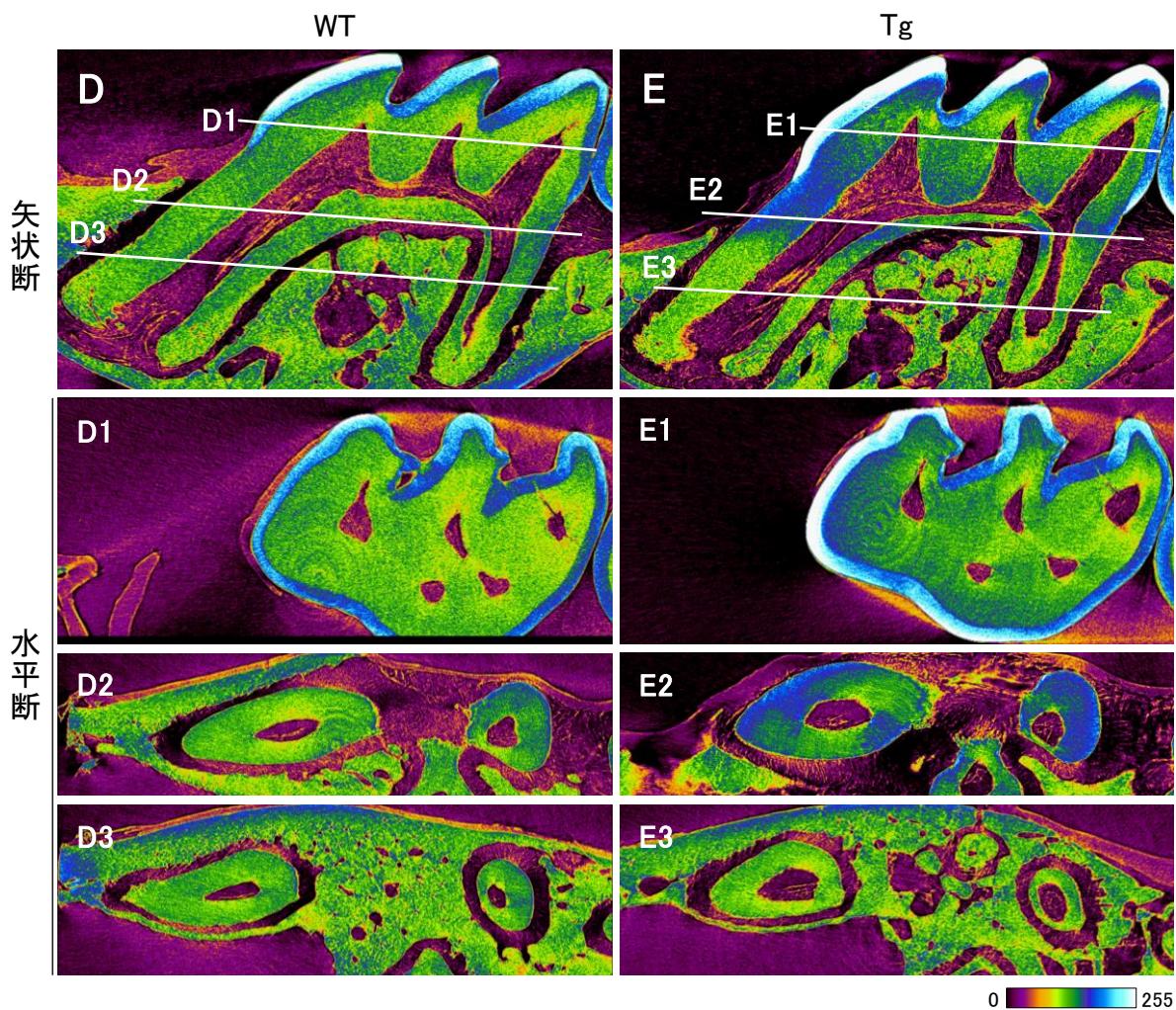


図 4. Micro computed tomography (μCT) 解析

D、E:12週齢の上顎第一臼歯の高解像度μCT画像

上顎第一臼歯の矢状断 (D、E)および水平断 (D1-D3、E1-E3)のμCT画像を示す。D、E 白実線 (D1-D3およびE1-E3)は水平断の各断面を示す。D1およびE1は歯冠部、D2およびE2は歯頸部(根分岐部付近)、D3およびE3は頬側根歯根部を示す。インジケーターは密度を255色で表しており、数字が高い色ほど密度が高いことを表す。

WT:野生型マウス、Tg:Fam20C-Tg。

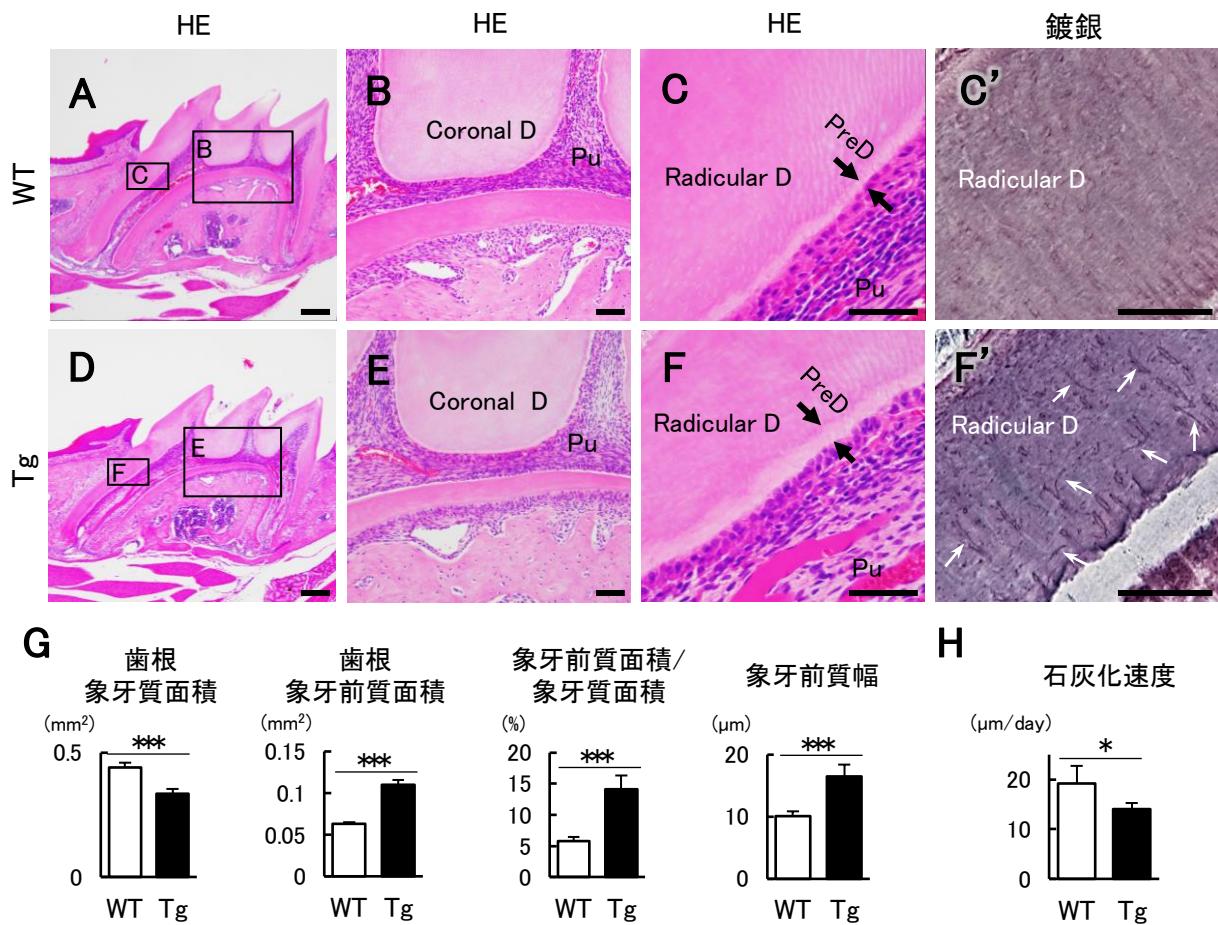


図 5. 組織学的解析

**A-F: 4週齢の上顎第一臼歯のHEおよび鍍銀染色像**

AおよびDはHE染色の全体像で、B、C、E、Fは、AおよびDの黒実線枠の拡大を示す。CおよびF矢印間は象牙前質幅を示す。C'およびF'は鍍銀染色像で、CおよびF相当部の象牙質の拡大を示す。F'白矢印は骨細管様構造を示す。

Coronal D: 歯冠象牙質、Radicular D: 歯根象牙質、Pu: 齧髄、PreD: 象牙前質。

スケール: A、Dは200 μm、B、C、C'、E、F、F'は50 μm。

**G、H: 4週齢の上顎第一臼歯歯根象牙質の形態計測**

HE染色標本上で形態計測を行った(G)。また、アリザリンおよびテトラサイクリンの1日当たりの標識線間距離を石灰化速度として計測した(H)。

WT = 6, Tg = 6, \*P<0.05, \*\*\*P<0.001。

WT: 野生型マウス、Tg: Fam20C-Tg。

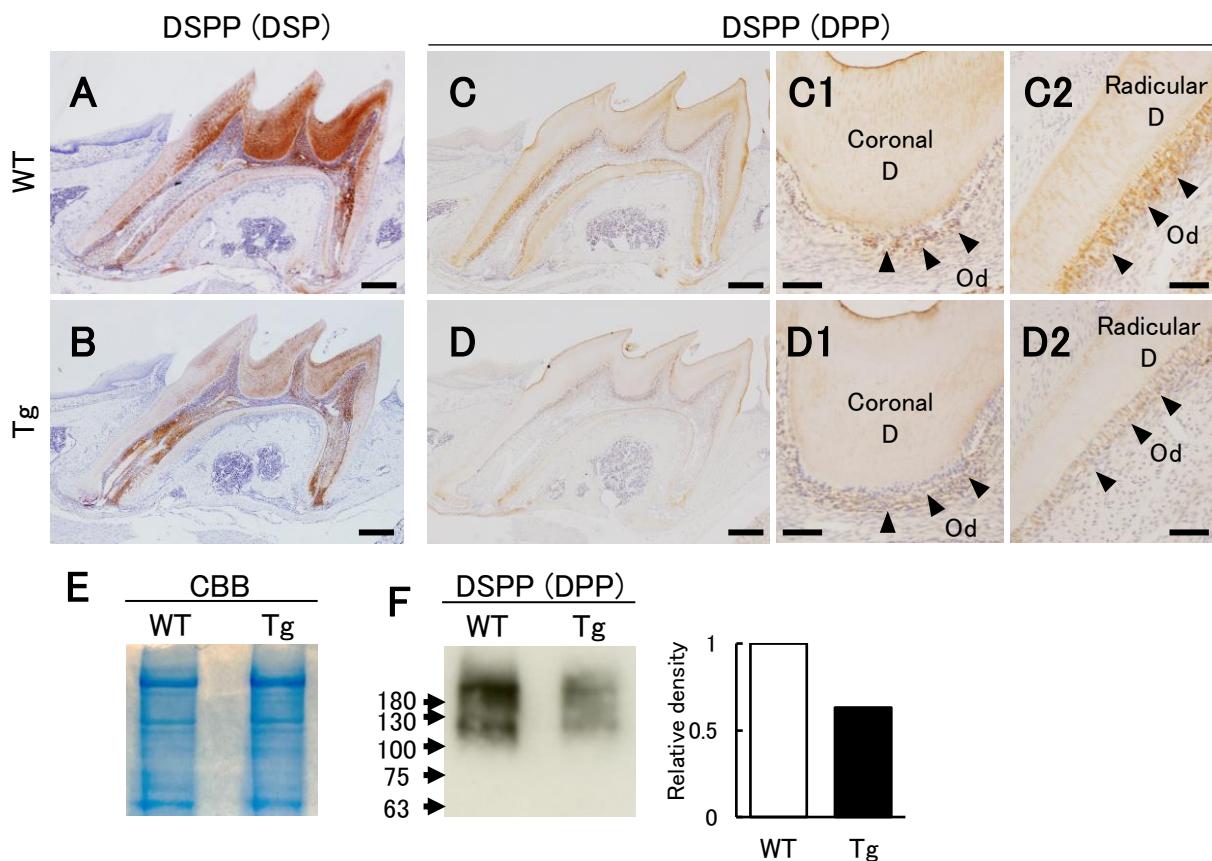


図 6. DSPPの発現解析

**A-D:4週齢の上顎第一臼歯におけるDSPPの発現分布**

抗DSP抗体およびDPP抗体を用いて、免疫組織化学的染色を行った。A-Dは全体像で、C1、D1はC、D歯冠部の拡大、C2、D2はC、D歯根部の拡大を示す。C1、C2、D1、D2 矢頭は象牙芽細胞を示す。

Coronal D:歯冠象牙質、Radicular D:歯根象牙質、Od:象牙芽細胞。

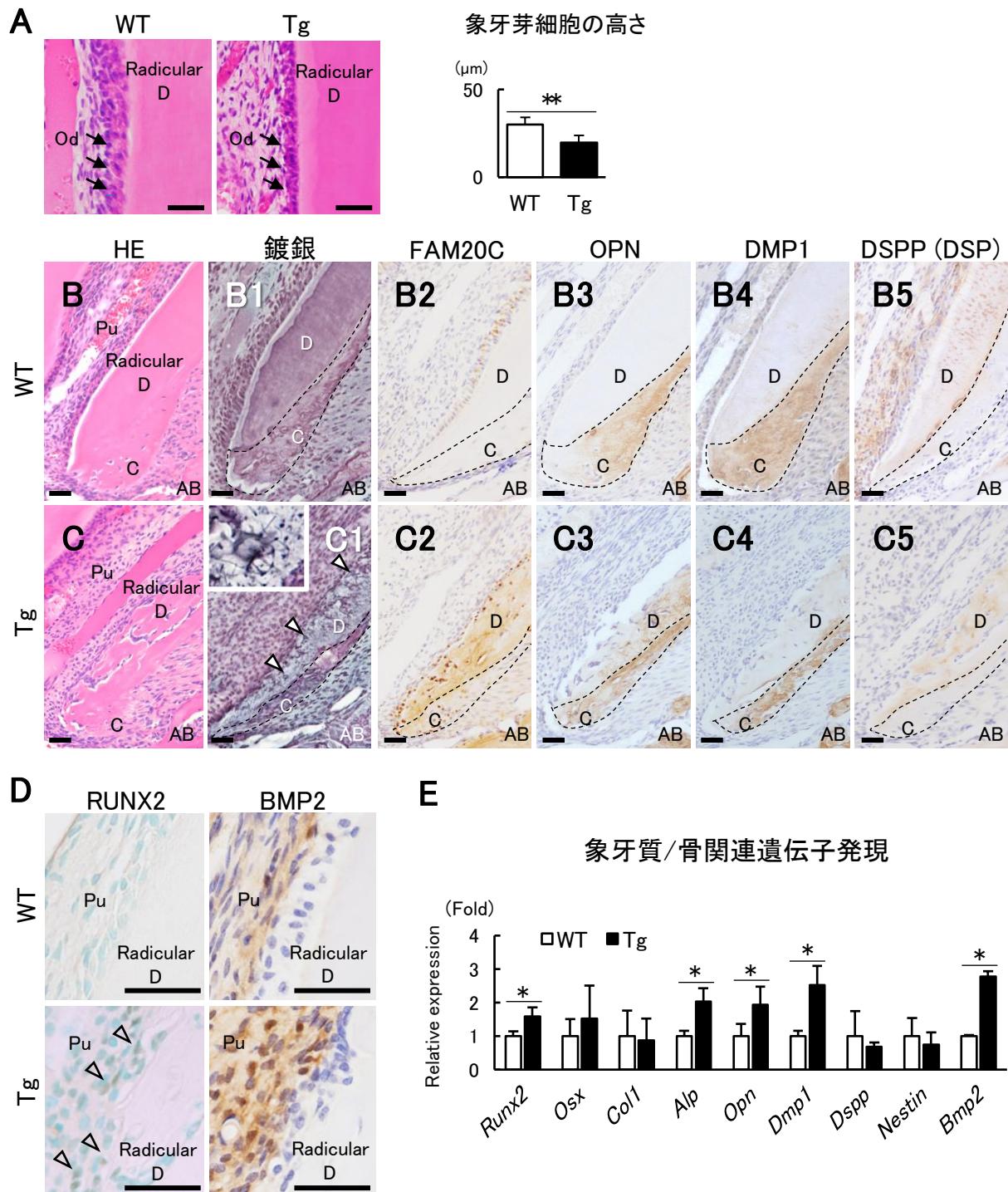
スケール:A～Dは200 μm、C1、C2、D1、D2は50 μm。

**E: CBB (Coomassie Brilliant Blue)によるゲル染色**

**F:4週齢の上顎第一臼歯におけるDSPP (DPP)の蛋白定量解析**

上顎第一臼歯から抽出した蛋白質において、抗DPP抗体を用いたウェスタンブロッティング法を行った。グラフは、WTを1とした検出バンドの相対密度を示す。

WT:野生型マウス、Tg:Fam20C-Tg。



## 図7.歯根象牙質の検討

### A:4週齢の上顎第一臼歯歯根中央部の組織学的解析

上顎第一臼歯歯根中央部のHE染色像を示す。矢印は象牙芽細胞を示す。グラフは象牙芽細胞の高さを示す。

WT = 6、Tg = 6、\*\* $P < 0.01$ 。

Radicular D:歯根象牙質、Od:象牙芽細胞。

スケール:50 μm。

### B-D :4週齢の上顎第一臼歯根尖部の組織学的解析

上顎第一臼歯の根尖部について、各種組織学的解析を行った。B、CはHE染色像、B1、C1は鍍銀染色像を示す。B2-B5およびC2-C5、Dは免疫組織化学的染色で、B2およびC2は抗OPN抗体、B3およびC3は抗DMP1抗体、B3C3は抗DSP抗体、D左はRUNX2抗体、D右は抗BMP2抗体を用いた。C1の矢頭は封入細胞、挿入図は封入細胞の拡大、Dの矢頭はRUNX2陽性細胞を示す。

Radicular D:歯根象牙質、Pu:歯髄、C:セメント質、AB:歯槽骨。

スケール:50 μm。

### E :4週齢の上顎第一臼歯における遺伝子発現解析

上顎第一臼歯から抽出したcDNAを用いて、Real-Time PCR法により各遺伝子の発現解析を行った。

WTを1とした相対発現量を示す。

WT = 6、Tg = 6、\* $P < 0.05$ 。

WT:野生型マウス、Tg:Fam20C-Tg。

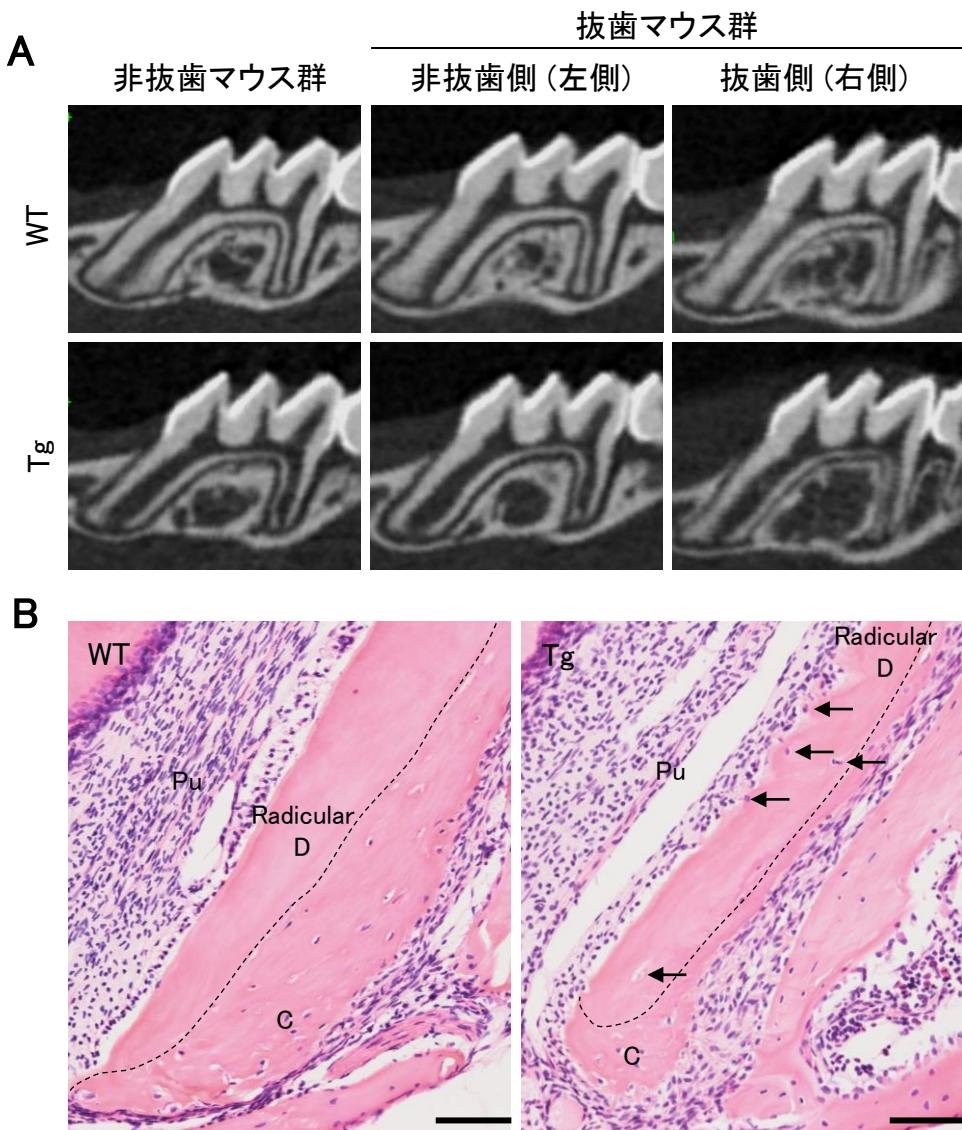


図 8. 抜歯実験

**A: 抜歯後5週(8週齢)の上顎第一臼歯のμCT解析**

8週齢の上顎第一臼歯の矢状断μCT画像を示す。抜歯マウス群は、右側下顎第一及び第二臼歯抜歯後5週のμCT画像を示す。

**B: 抜歯後5週(8週齢)の上顎第一臼歯(抜歯側)根尖部のHE染色像**

矢印は封入細胞を示す。

異常象牙質には高円柱状の象牙芽細胞はみられない。

Radicular D:歯根象牙質、Pu:歯髓、C:セメント質。

スケール: 100 μm。

WT:野生型マウス、Tg:Fam20C-Tg。

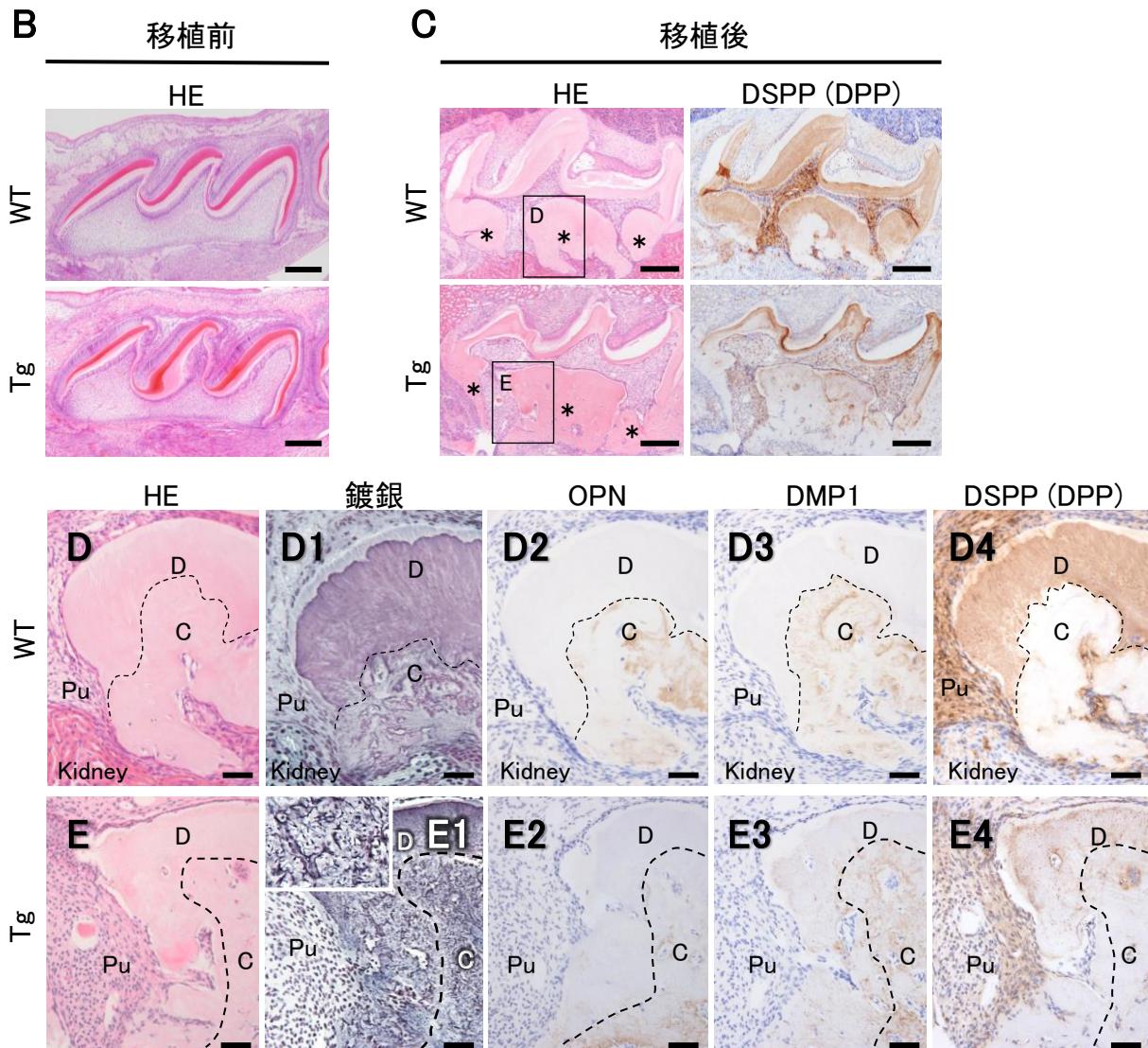
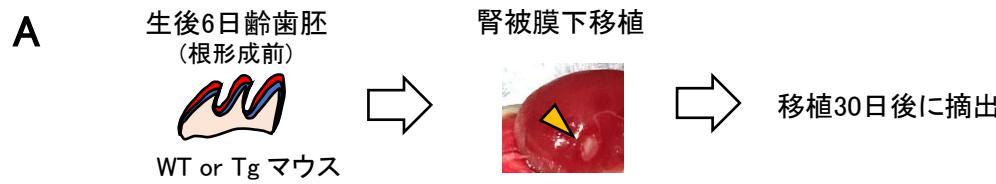


図 9. 腎被膜下移植実験

**A: 実験手順**

生後6日齢マウスの上顎第一臼歯歯胚を腎被膜下へ移植し、30日後に組織学的解析を行った。

**B: 移植時(生後6日)の歯胚のHE染色像**

歯根形成前の歯胚のHE染色像を示す。スケール: 200 μm。

**C: 移植後30日の歯胚のHE染色およびDSPPの発現分布**

左は腎移植後30日の歯胚のHE染色像で、右は抗DPP抗体を用いた免疫組織化学的染色像を示す。

\*は歯根様構造を示し、黒実線枠は歯根部の拡大を示す。スケール: 200 μm。

**D-F: 移植後30日の歯胚歯根相当部の組織学的解析**

D, E1はC黒実線枠の拡大、D1, E1は鍍銀染色を示す。D2-D4およびE2-E4, Fは免疫組織化学的染色で、D2およびE2は抗OPN抗体、D3およびE3は抗DMP1抗体、D4およびE4は抗DPP抗体を用いた。E1挿入図は封入細胞の拡大、F矢頭はRUNX2陽性細胞を示す。

D: 象牙質、Pu: 歯髄、C: セメント質。

スケール: 50 μm。

WT: 野生型マウス、Tg: Fam20C-Tg。