

氏 名 (本籍)	佐 <sup>さ</sup> 藤 <sup>とう</sup> 秀 <sup>ひで</sup> 則 <sup>のり</sup>
学 位 の 種 類	博 士 ( 歯 学 )
学 位 記 番 号	歯 博 第 1 7 5 号
学位授与年月日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	東北大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯 学 臨 床 系
学 位 論 文 題 目	ラット臼歯の有細胞セメント質形成過程における I 型コラーゲン, 骨シアロタンパク質及びオステオカルシンの遺伝子発現に関する研究

(主査)

論文審査委員

教授 真 柳 秀 昭

教授 加賀山 学

教授 三 谷 英 夫

## 論 文 内 容 要 旨

有細胞セメント質の組織構造は骨に類似しその基質にはⅠ型コラーゲン、骨シアロタンパク質(BSP)及びオステオカルシン(OC)等、骨と共通する細胞外基質タンパクが含まれる。従来セメント質における細胞外基質の局在は、主として免疫組織学的に検索されてきたが、これらの細胞外基質がいつ有細胞セメント質を形成するセメント芽細胞で合成されるのか、すなわちセメント芽細胞のどの分化段階で細胞外基質に対する遺伝子発現を開始するのかについては不明な点が多い。In Situ ハイブリダイゼーション(ISH)は個々の細胞の遺伝子発現を検討する上で優れた方法であり、目的とする遺伝子の細胞内での発現時期を特定することが可能である。したがって本研究ではISHを用いて、ラット臼歯有細胞セメント質形成過程において、セメント芽細胞の分化に伴うⅠ型コラーゲン、BSP及びOCの遺伝子発現について明らかにすることを目的とした。

本研究では、生後3週、4週及び6週齢のWistar系雄性ラットを使用した。ネンブータル麻酔下において、0.1Mリン酸緩衝液でPH7.4に調整した4%パラホルムアルデヒド—0.5%グルタルアルデヒド固定液による灌流固定(室温)の後、上顎を摘出し、同様の固定液により4℃で一昼夜浸漬固定した。固定後上顎をEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液(PH7.4)により低温脱灰(4℃)し、エタノール系列による脱水及びキシレン浸透の後パラフィンに包埋し、水平断連続切片(5 $\mu$ m)を作製した。隣接の切片について、キシレンによる脱パラフィンの後、一部にヘマトキシリン—エオジン染色(H-E染色)を、また一部にⅠ型コラーゲン、BSP及びOCに対するISHを施した。なお、観察に際して上顎第一臼歯(M1)の遠心頬側根根尖側1/3付近を観察の対象とした。

生後3週齢で有細胞セメント質の形成が始まり、4週、6週齢と加齢するのに伴い有細胞セメント質全体の厚みは増大した。3週及び4週齢においてはセメント芽細胞と周囲の歯根膜細胞は形態的に識別できなかったが、6週齢ではセメント質上に配列するセメント芽細胞が明瞭に認められた。Ⅰ型コラーゲンの遺伝子発現は3週齢のセメント芽細胞と歯根膜細胞に広く認められ、4週以降これら陽性のシグナルは低下した。一方、BSP及びOCの遺伝子発現は3週齢ラットのセメント芽細胞に強く、又近傍の歯根膜細胞に弱く認められた。これら陽性のシグナルは、4週齢で著しく低下し6週齢ではほとんど認められなかった。

以上の結果より有細胞セメント質におけるⅠ型コラーゲン、BSP及びOCの遺伝子発現は分化初期のセメント芽細胞に強く発現することが示唆された。

## 審 査 結 果 要 旨

従来からセメント質形成における遺伝子組織学的研究が行われてきたが、これらの報告とは異なり、本研究は観察の対象を有細胞セメント質とし、その形成過程における細胞外基質の遺伝子発現を検索している点が大きな特色である。また、有細胞セメント質の形成過程において、観察の対象とする歯根を特定し、I型コラーゲン、骨シアロタンパク質（以下BSP）及びオステオカルシン（以下OC）の遺伝子発現を同時に検討した点で本研究はきわめて独創的である。

本研究では有細胞セメント質形成過程が観察される時期として適切な週齢のラットを使用し、試料作製法は組織および細胞外基質の遺伝子発現を検討する目的にかなっている。また試料から連続切片を作製し、ヘマトキシリンーエオジン染色、I型コラーゲン、BSP及びOCに対するin situ hybridization (ISH)を施した後、条件を統一して顕微鏡写真を撮影している。よって研究目的にかなった適切な方法がとられており、得られた結果は信頼に値するものと考えられる。

本研究では以下の結果が得られている。

1. 生後3週齢で有細胞セメント質の形成が始まり、4週、6週齢と加齢するのに伴い有細胞セメント質全体の厚みは増大した。3週及び4週齢においてはセメント芽細胞と周囲の歯根膜細胞は形態的に識別できないが、6週齢ではセメント質上に配列するセメント芽細胞が明瞭に認められた。
2. I型コラーゲンの遺伝子発現は、3週齢のセメント芽細胞と歯根膜細胞に広く認められ、4週以降これら陽性のシグナルは低下した。
3. BSPの遺伝子発現は3週齢のセメント芽細胞に強く、また近傍の歯根膜細胞に弱く認められた。これら陽性のシグナルは、4週齢で著しく低下し6週齢ではほとんど認められなかった。
4. OCの遺伝子発現は3週齢のセメント芽細胞に強く、また近傍の歯根膜細胞に弱く認められた。これら陽性のシグナルは、4週齢で低下し6週齢ではほとんど認められなかった。

以上からセメント質近傍の歯根膜細胞には、セメント芽細胞の前駆細胞が存在し、分化してBSP及びOCの遺伝子を発現しセメント芽細胞となり、有細胞セメント質を形成する可能性があることが示唆される。又、3週齢においてI型コラーゲン、BSP及びOCの強い遺伝子発現が認められたことから、この時点において有細胞セメント質を形成するセメント芽細胞の形成能が高いと考えられる。

したがって本研究は有細胞セメント質の特性を明らかにする上で非常に有用な情報をもたらすものと思われる。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。