

氏名(本籍) : 三谷薫子

学位の種類 : 博士(歯学) 学位記番号 : 歯博第534号

学位授与年月日 : 平成22年3月25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) 歯科学専攻

学位論文題目 : アメロジェニンスプライスアイソフォームの軟骨細胞分化に与える影響に関する研究

論文審査委員 : (主査) 教授 五十嵐 薫  
教授 笹野 泰之 教授 福本 敏

## 論文内容要旨

アメロジェニンは、エナメル質に存在する主要なタンパク質であり、エナメル質形成において重要な役割をもつとされている。アメロジェニンはこれまで、エナメル芽細胞に特異的に発現するタンパク質と考えられてきたが、近年の研究では幅広い組織での発現が確認されつつあり、特に M180, LRAP の 2 つのアメロジェニンアイソフォームは、間葉系細胞において、細胞間のシグナル伝達物質としての役割を担っていると考えられるようになってきた。本研究では、2 つのアメロジェニンアイソフォーム、M180 と LRAP が、株化軟骨細胞(ATDC5)における軟骨分化に対してどのような影響をもたらすか検討した。

マウス M180 および LRAP タンパク発現ベクターを作製後、FreeStyle293-F 細胞にトランスフェクションを行い、10日間振盪培養を行った。得られたアメロジェニンタンパク含有培地を濃縮し、これを分化培地に一定の割合で添加した培地を用いて MC3T3-E1 細胞、ATDC5 細胞の培養を行い、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、石灰化ノジュール形成、軟骨基質分泌、骨芽細胞および軟骨細胞分化マーカーの遺伝子発現変化について解析した。

その結果、① MC3T3-E1 細胞において、回収した M180 と LRAP は石灰化ノジュール形成、骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を上昇させ、大腸菌由来のアメロジェニンをを用いた過去の報告と同様の結果が得られた。② ATDC5 細胞において、M180 と LRAP は、ALP 活性を上昇させるとともに、軟骨基質分泌を促進した。③ ATDC5 細胞において、LRAP は軟骨分化誘導後 7 日以内に *Runx2*, *Col2a1*, *Aggrecan* の遺伝子発現を有意に上昇させ、M180 と LRAP は軟骨分化誘導後 14 日以後 *Alkaline phosphatase*, *Aggrecan*, *Col10a1*, *Osteopontin* の遺伝子発現を有意に上昇させた。

以上のことから、2 つのアメロジェニンアイソフォーム M180, LRAP は、軟骨細胞株 ATDC5 細胞の ALP 活性を上昇させるとともに、軟骨基質の分泌を促進させ、軟骨細胞の分化を促進させることが示唆された。

## 審査結果要旨

アメロジェニンとは主要なエナメル基質タンパクであり、エナメル質の形成に重要な役割を果たしている。このタンパクはエナメル芽細胞に特異的に発現すると考えられていたが、最近には様々な組織に発現していることが明らかにされており、中でも主要なアイソフォームである M180 と LRAP は歯根膜、セメント質、骨などの組織を構成する細胞において発現が確認されている。さらに、これらのアメロジェニンアイソフォームは、本来の細胞外基質としての役割ではなく、むしろ細胞間のシグナル伝達物質としてこれらの細胞の増殖、分化、機能を制御している可能性が示唆されている。本研究は、顎顔面複合体の成長発育に重要な役割を担っている軟骨組織に着目し、M180 と LRAP が培養軟骨細胞の分化に及ぼす影響を明らかにしようとするもので、軟骨形成に対するアメロジェニンの作用を解明する上で重要な研究テーマである。

本研究では、上記 2 種のアメロジェニンタンパクを遺伝子組み換え技術を用いて作製し、実験に供している。これらのアメロジェニンは、内毒素の影響を排除するためには乳類細胞に発現させていること、2 種の抗体を用いた Western Blotting 法により発現を確認していること、骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞を用いて活性を確認していることなどから、リコンビナントタンパクとしての信頼性は高いと判断する。軟骨細胞としては、軟骨細胞の前駆細胞の性質を有しているマウス由来軟骨細胞系細胞株 ATDC5 を使い、M180 または LRAP の存在／非存在下で最長 28 日間培養し、詳細な解析を行っている。すなわち、培養 14、28 日目には ALP 染色と Alcian blue 染色を施し、培養 1、7 日目には軟骨細胞の初期分化に関連する *Runx2*, *Sox9*, *Col2a1*, *Aggrecan* の遺伝子発現を、培養 14、28 日目にはそれらに加えて成熟した軟骨の分化マーカーである *ALP*, *Col10a1*, *OPN* の遺伝子発現を調べており、研究目的に即した妥当な実験計画が立てられている。

研究結果として以下のことが明らかにされた：① M180 と LRAP は MC3T3-E1 細胞の分化を促進し、石灰化ノジュールが形成された。② LRAP は ATDC5 細胞の初期分化を促進した。③ M180 と LRAP は ATDC5 細胞の肥大軟骨細胞マーカーの発現を促し、ALP 活性を上昇させるとともに軟骨基質の分泌を促進した。

本研究は、アメロジェニンが軟骨細胞の分化を促進することを明確に示した点で高く評価できる。また、2 種のスプライスアイソフォームの作用が異なる可能性を示唆したことも特筆すべき点である。このように、本論文は軟骨形成に及ぼすアメロジェニンの作用を明らかにする上で極めて重要な情報を提供していることから、博士（歯学）の学位授与に値するものと判断する。