

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791764

研究課題名（和文）リン酸・ピロリン酸代謝異常におけるセメント質および骨形成機序の解明

研究課題名（英文）Research of cementum and bone formation in phosphate pyrophosphate imbalance condition

研究代表者

佐藤 淳（SATO SUNAO）

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：70335660

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体内の硬組織、その中でも歯周組織を構成する硬組織形成細胞が、リン酸・ピロリン酸バランス異常状態でどのような反応性の違いを示すのかを、リン酸・ピロリン酸バランス異常マウスである PC-1 遺伝子異常マウスを用いて検討した。その結果、リン酸・ピロリン酸バランス異常状態では、セメント芽細胞と骨芽細胞で PC-1 遺伝子発現状況が異なること、歯槽骨では骨基質タンパク質の一つであるオステオポンチンの発現領域が増加していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to examine the effect of Pi/PPi imbalance on gene expression in tissues associated with periodontal tissues, i. e., osteoblasts and cementoblasts, in vivo. Incisors and molars obtained from mice with PC-1 mutations were examined at the light microscopic level with immunohistochemical staining. Histological observations indicated that not only the molars but also the incisors from PC-1 mutant mice showed a marked increase in the amount of cementum when compared to wild-type. Immunohistochemical observation indicated that cementoblasts in wild-type showed high PC-1 expression compared to osteoblast and osteoblasts in PC-1 mutant mice showed high Osteopontin expression compared to wild-type osteoblast. These results suggest that functional changes in proteins such as PC-1, by affecting Pi/PPi ratio, may in turn affect mineralized tissue formation by altering expression of key genes and associated proteins in osteoblasts and cementoblasts, and further, may impact differentiation potential in follicle cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：リン酸、ピロリン酸、セメント質、骨、PC-1 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する硬組織形成の際には、リン

酸は、リン酸カルシウム結晶の基質として石灰化へ促進的に作用しており、その反対にピ

ロリン酸は石灰化へ阻害的に作用している。リン酸やピロリン酸の代謝に関与する各種の酵素が硬組織形成に重要な役割を果たしており、ヌクレオシド3リン酸の加水分解からピロリン酸を産生する酵素である PC-1 に遺伝子異常があり、PC-1 の活性低下が引き起こされ、ピロリン酸の産生が減少する **tiptoe walking** マウスと呼ばれるマウス実験動物においては、骨形成の促進、異所性石灰化を示すことが報告されている。さらに、ピロリン酸を細胞内から細胞外へと輸送するトランスポーターである ANK に遺伝子異常を有するマウスでも関節に石灰沈着を伴う炎症が引き起こされ、骨の過成長と関節破壊が起こることが報告されている。この PC-1 と ANK 遺伝子異常マウスではセメント質に高度の肥厚も観察されている。

PC-1、ANK 遺伝子異常マウスの歯周組織では、セメント質の肥厚が観察される一方で、歯槽骨には全身の骨で観察されるような石灰化の異常は認められず、セメント芽細胞株 OCCM-30 を用いた実験で、リン酸は、単にリン酸カルシウムの基質として機能しているだけでなく、石灰化に関連した遺伝子の発現を直接コントロールしていたことから、歯周組織ではリン酸・ピロリン酸代謝によるセメント質形成と骨形成への調節機序が全く同じではないと考えられる。これまでに、セメント芽細胞、骨芽細胞、歯小囊細胞で、リン酸添加によるリン酸・ピロリン酸代謝異常状態により発現が調節される遺伝子は、細胞株の種類により違いがあることを明らかにしている（2009 年度骨代謝学会及び歯科基礎医学会にて学会発表）。セメント芽細胞株や骨芽細胞株等の分化・成熟した細胞株ではリン酸添加によるリン酸・ピロリン酸バランス異常により骨基質タンパク質 DMP1 の発現が上昇しているが、歯小囊細胞株ではその発現に違いは認められなかった。また、セメント芽細胞株や歯小囊細胞株では、オステオカルシンの発現が抑制されたが、骨芽細胞株では発現の変化は見られなかった。

2. 研究の目的

これまでの研究で明らかにしてきた歯周組織を構成する細胞におけるリン酸・ピロリン酸バランス異常に対する遺伝子発現の違いが生体内においてはどのように観察されるのかを比較・検討し、リン酸・ピロリン酸バランス異常が硬組織形成、とりわけ、歯周組織を構成する硬組織にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、PC-1 遺伝子異常を有するマウスを飼育・交配し、6 週齢♂の下顎骨の検体を採取し、歯周組織周囲における骨関連遺

伝子の発現検索を行った。加えて、歯周組織の硬組織形成を計測し、遺伝子発現との関連についての考察を行った。

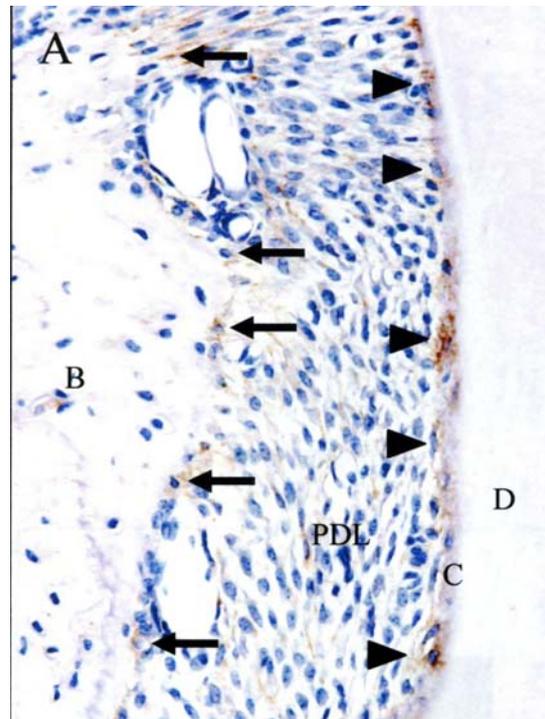
4. 研究成果

(1) PC-1 遺伝子異常マウスにおける PC-1 発現の検索

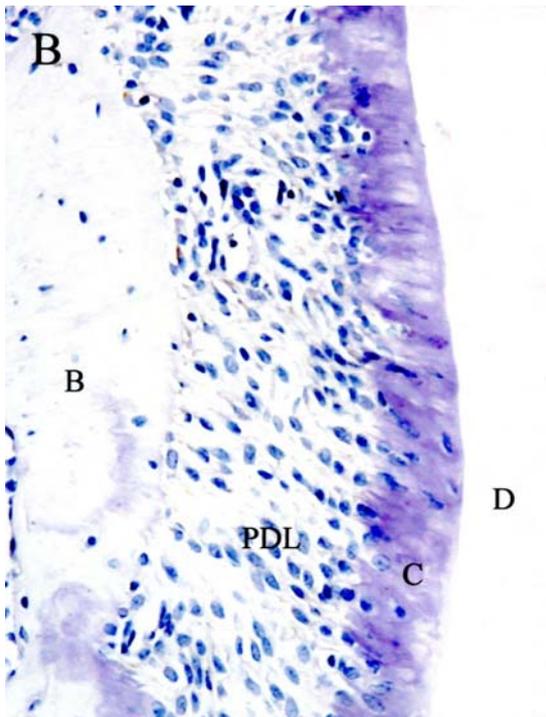
PC-1 遺伝子異常マウス群と正常コントロールマウス群における 6 週齢♂を選択し、下顎骨のサンプルを回収した。これら二つの群における PC-1 発現を観察するために組織切片を作製し、PC-1 抗体を用いた免疫染色により歯周組織における PC-1 発現を検討した。

二つの群の下顎第一臼歯歯周組織の前額断の切片を用いて免疫染色を行うと、正常コントロール群の下顎第一臼歯の歯根膜部に面した歯槽骨表層の骨芽細胞に PC-1 の陽性反応が認められた（図 1A 中の矢印）。

さらに、セメント質表層のセメント芽細胞層には骨芽細胞層よりも強い PC-1 の陽性反応が認められた（図 1A 中の矢頭）。

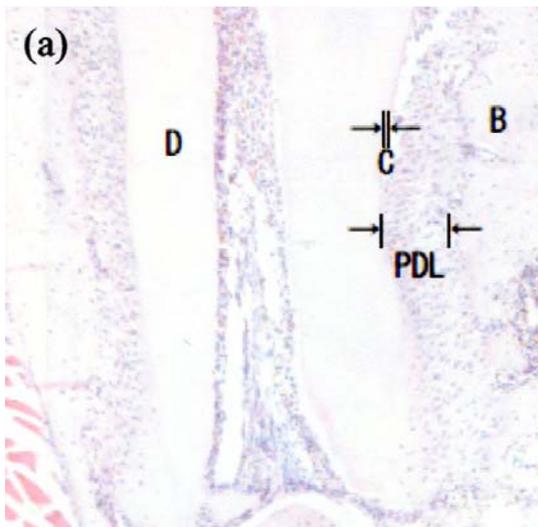


一方、PC-1 遺伝子異常リン酸・ピロリン酸代謝異常マウス群では、骨芽細胞層およびセメント芽細胞層に PC-1 の陽性反応はほとんど認められなかった（図 1B）。

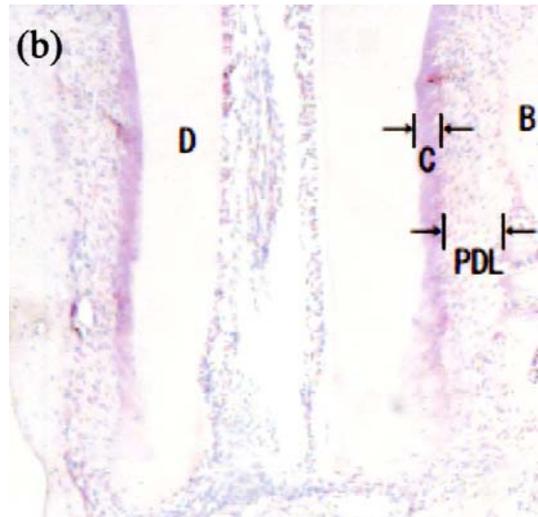


(2) 歯周組織を構成する組織成分の構成比率の検討

(1) における検索の結果、PC-1 遺伝子異常マウスでは、免疫組織化学染色において PC-1 の陽性所見がほとんど認められなかったのに対して、正常コントロール群のマウスでは、セメント芽細胞層と骨芽細胞層に陽性所見が観察され、その陽性所見はセメント芽細胞層の方がより強い陽性所見であったことから、歯周組織を構成する歯根膜、歯槽骨、セメント芽細胞の構成比率を比較検討するために、歯周組織におけるセメント質と歯根膜幅径の測定を行った。

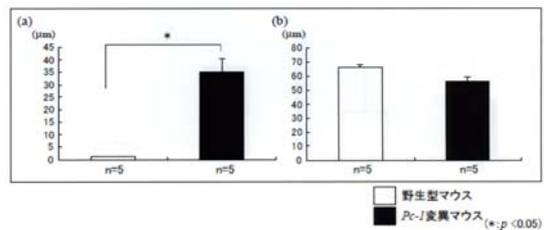


下顎第一臼歯遠心根において、これらの測定を行うと、正常コントロール群マウスの下顎第一臼歯遠心根のセメント質幅径は平均 1.2 μm であったが、PC-1 遺伝子異常マウスの下顎第一臼歯遠心根のセメント質幅径は



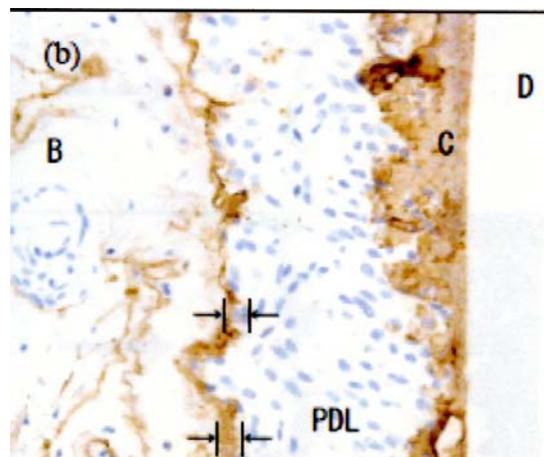
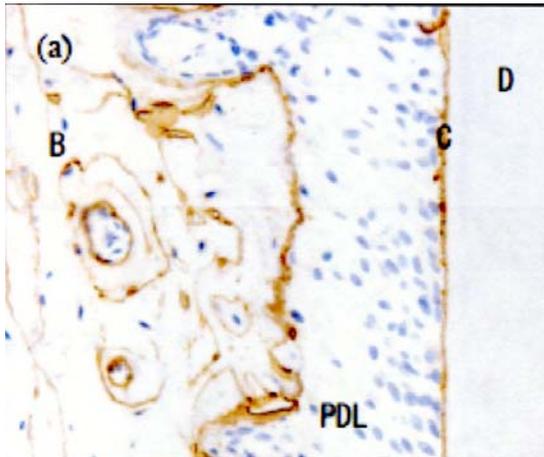
平均 35.0 μm であり、正常コントロール群マウス (図 2a) に比べて PC-1 変異マウス (図 2b) では下顎第一臼歯遠心根のセメント質幅径が約 30 倍に肥厚していた (図 2 棒グラフ a)。

一方、下顎第一臼歯遠心根における歯根膜の幅径は正常コントロール群マウスと PC-1 遺伝子異常マウスの間に有意な差は認められなかった (図 2 棒グラフ b)。



(3) 歯周組織における硬組織基質の発現分布の検討

(1) と (2) の結果をもとに、さらに歯周組織における硬組織基質の発現分布を検討するために、骨組織およびセメント質に豊富に含まれるオステオポンチンの免疫組織化学染色を行った。オステオポンチン陽性所見は、対照群マウスと PC-1 遺伝子異常マウスの歯槽骨では、その表層部分および骨改造線に沿って認められ、正常コントロール群マウスと PC-1 遺伝子異常マウスのセメント質ではその全層に渡ってオステオポンチン陽性所見が認められ、両者におけるオステオポンチンの発現分布に大きな変化は見られなかった。しかしながら PC-1 遺伝子異常マウスの歯槽骨表層部分のオステオポンチン陽性領域幅 (図 3b) は正常コントロール群マウスの同領域幅 (図 3a) より増幅していることを示唆する免疫染色結果が得られた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計2件)

- ① Y. Yamamoto, S. Sunao et al, Effects of inorganic phosphate on the dento-alveolar complex, in situ and in vitro, ASBMR 2010 Annual Meeting, October 15-19, 2010, Toronto (Canada)
- ② 山元有理、佐藤淳ら、リン酸・ピロリン酸バランスの変化による歯周組織への影響、第52回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2010年9月20-22日、タワーホール船堀(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 淳 (SATO SUNAO)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：70335660