

氏名 尾山 正高

授与した学位 博士  
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 甲 第 2308 号

学位授与の日付 平成 14 年 3 月 25 日

学位授与の要件 歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 歯髄の損傷に際して特異的に発現する遺伝子の研究

論文審査委員 教授 吉山 昌宏 教授 滝川 正春 教授 村山 洋二

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

一般に、組織は感染や損傷を受けると、炎症反応を経て壊死に陥るかあるいは治癒反応へと移行する。しかし、歯髄では急性または慢性に炎症が経過した後に、壊死に陥ることが多い。

損傷歯髄の生物学的特徴はこれまで病理組織学のおよび免疫組織学的な研究結果から明確にされてきたが、歯髄を構成する細胞がどのように損傷を認識し、また応答しているのかについての分子レベルの特徴は全く分かっていない。さらに、歯髄組織は神経細胞突起、線維芽細胞、脈管系の細胞、および石灰化物産生細胞である象牙芽細胞に代表される多くの細胞によって構成されるので、損傷という特別な条件下で、これらの細胞の動態が制御される機構は極めて複雑である。

歯髄疾患の治療は、多くの場合、抜髄によって対応されている。これは、歯髄炎の現代生物学に基づく病態を捉えた治療法が開発されていないからである。損傷歯髄の特徴を細胞および分子レベルで明らかにすれば、新たな概念に基づく歯髄疾患の治療法を生み出すことができるに違いない。

本研究は、ラット歯髄組織に損傷を与えた時に発現量に変化を来す遺伝子を検出し、その機能的性状から損傷歯髄の病態を考察しようとするものである。

### 【材料および方法】

1. 被験歯髄組織：6週齢のウィスター系雄性ラットの右側上顎第1臼歯舌側咬頭に、歯科用バーを用いて注水しながら歯髄に近接する窩洞を形成し、窩洞を露出させたまま通常の方法で1週間飼育した後に、歯牙を抜歯および分割して歯冠部歯髄を取り出し、被験刺激歯髄組織とした。対照は反対側の同名歯牙の歯髄に刺激を与えない条件で調整した無刺激の歯髄組織である。
2. 組織標本：刺激あるいは無刺激の歯髄組織標本は、常法に従ってパラフィン包埋を行い、ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin : H. E.) 染色して作成した。
3. 相補鎖 DNA (cDNA) の合成：被験歯髄組織から、TRIZOL<sup>®</sup> 試薬 (Life Technologies) を用いて全 RNA を抽出し、DNase I (Life Technologies) 処理後、ダイナビーズ mRNA 精製キット (Dynals) を用いて poly (A)<sup>+</sup> RNA を oligo (dT)<sub>25</sub>-magnetic beads にハイブリダイズさせ mRNA を調製した。この mRNA を鋳型とし、beads 上の oligo (dT)<sub>25</sub> をプライマーとして、Super Script<sup>™</sup> II (Life Technologies) を用いる逆転写反応によって (-) 鎖 cDNA を合成した。さらに、terminal transferase (Promega) を用いて 3' 末端にポリ A を付加した (-) 鎖 cDNA を鋳型とし、(-) 鎖 cDNA に相補の (+) 鎖 cDNA を合成した。
4. サブトラクティブハイブリダイゼーション：Leygue らの方法に従った。
5. 遺伝子のクローニング：プラスミドベクター pUC 118 (宝酒造) に挿入し、宿主大腸菌 XL-1 blue MRF' (Stratagene) を形質転換することによって遺伝子をクローニングした。
6. 遺伝子の塩基配列の決定および相同性の検索：塩基配列の決定は dideoxy chain-termination 法によって行った。得られた塩基配列は遺伝子データバンク (NCBI Blast : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) に照合して相同性を検索した。
7. リバースノーザンハイブリダイゼーション：Kang らのリバースドットプロット法を一部改変して行った。すなわち、メンブレンに転写した検索対象遺伝子断片に対して、歯髄組織由来の cDNA を <sup>32</sup>P 標識したプローブをハイブリダイズさせた。なお、イメージングアナライザー (FUJIX) でシグナルを検出した。

8. ノーザンハイブリダイゼーション：常法に従って行った。なお、プローブは cDNA 断片を <sup>32</sup>P 標識して合成し、メンブレンは Rat MTN<sup>®</sup> Blot (Clontech) を用いた。
9. 遺伝子のスクリーニング：ブランクハイブリダイゼーション法によって Uni-ZAP<sup>®</sup> XR Rat Liver cDNA Library (Stratagene) をスクリーニングして遺伝子を得た。
10. 遺伝子の 5' 側欠損領域の同定：RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法によって行った。すなわち、ライブラリーのスクリーニングによって得た約 1.8 kb の遺伝子の 5' 側に 2 組の遺伝子特異的プライマーを設計し、Rat liver Marathon<sup>®</sup>-Ready cDNA kit (Clontech) を用いて nested PCR を行い、目的遺伝子のみを増幅して欠損領域を同定した。
11. 遺伝子の解析：遺伝子の翻訳部位の読み枠を推定してアミノ酸配列に変換し、Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) プログラム (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) を用いて、この遺伝子がコードするタンパクの構造および機能ドメインを解析した。

## 【結果および考察】

1. 窩洞形成後の歯髄：窩洞形成部直下の象牙芽細胞層は細胞が泡沫化しており、歯髄髄角部の細胞は窩洞形成部付近への集積を示した。この組織像および過去の研究結果から、窩洞形成一週間後は、損傷を受けた歯髄の炎症が鎮まり、組織の修復過程にある時期であると推定した。したがって、このモデルにおいて、損傷を受けた歯髄が治癒に向かう特徴的な反応を捉えることができると考えた。
2. 損傷によって発現量が変化した遺伝子：刺激歯髄組織由来の cDNA と対照歯髄組織由来の cDNA とのサブトラクションを相互に行って、刺激歯髄由来の cDNA に過剰に存在するものは損傷によって発現量が増加した遺伝子、反対に対照歯髄由来の cDNA に過剰に存在するものは損傷によって発現量が減少した遺伝子とした。250 bp 以上のサイズのインサートを有するものはそれぞれ 16 個と 7 個であった。既知の遺伝子であるカテプシン B ならびにチトクロム c 遺伝子の発現量が増加した結果から、損傷歯髄では炎症反応や細胞のアポトーシスが起っており、またコラーゲン  $\alpha 2$  鎖遺伝子とラミニン  $\gamma 2$  鎖遺伝子の発現量が減少した結果から、組織のリモデリングおよび神経細胞突起の変性または消失が起っていると考察した。さらに、損傷によって発現量が変化した遺伝子は、未知の遺伝子と EST 遺伝子を合計 7 種含んでおり、なかでもクローン #11 (EST 763748) は、刺激歯髄において顕著に発現量が増加することをリバースノーザン法で確認した。
3. クローン #11 の全長スクリーニング：クローン #11 は肝臓に強く発現していたため、ラット肝臓 cDNA ライブラリーを用いて遺伝子をスクリーニングし、さらに RACE 法を応用して 5' 欠損領域を同定し、遺伝子の全長 (3.8 kb) を得た。この遺伝子はラット損傷誘導遺伝子と名付けた。
4. 損傷誘導遺伝子の解析：ラット損傷誘導遺伝子は未知の配列を有しており、新規遺伝子であった。これはヒト FIP-2 と部分的に相同の塩基配列を示し、さらにヒト FIP-2 と同一の機能ドメインの存在が予想されることから、神経細胞のアポトーシスを制御するタンパクをコードする遺伝子であると推定した。

## 【結論】

遺伝子発現量の変化に注目して、歯髄の損傷に際して特異的に発現する遺伝子をサブトラクション法によって検出した。その結果、既知のものは炎症反応、細胞のアポトーシスおよび組織のリモデリングに関与する因子をコードする遺伝子であった。このことは遺伝子発現量の変化が、既に報告されている損傷歯髄の病理組織学的な変化を反映することを示しており、損傷歯髄の病理を理解する上で鍵となる遺伝子をサブトラクション法を用いて検出できることを示している。

損傷に際して発現量が増加する新規遺伝子として同定したラット損傷誘導遺伝子は、神経細胞のアポトーシスを制御するタンパクをコードする遺伝子であると推定した。さらに、発現量が減少する既知の遺伝子として同定したラミニン  $\gamma 2$  鎖は、神経細胞の分化や成長に関与するタンパクをコードする遺伝子である。このことから、突起が歯髄に分布している神経細胞の動態は、損傷歯髄の特徴を細胞および分子レベルで明らかにする上で今後注目すべき対象である。

## 論文審査結果の要旨

歯髄疾患の病態は主として病理組織学的および免疫組織学的な像として示されているものの、分子生物学的には明確ではない。本研究は損傷を受けた歯髄に発現する特異遺伝子を検出し、その遺伝子の機能的性状の考察を行い、歯髄病変の分子像を探ろうとするものである。

申請論文は次の内容を示すものであった。歯髄の損傷に際して特異的に発現する遺伝子を、サブトラクティブハイブリダイゼーション法とリバースノーザンハイブリダイゼーション法を用いて、発現量の変化から検出した。それらのうち既知の遺伝子と相同性を示すものは炎症反応、細胞のアポトーシスおよび組織のリモデリングに関与する分子をコードする遺伝子であった。また、これまでに報告のない未知の遺伝子が含まれていた。このものは神経細胞のアポトーシスの役割を担う遺伝子であると考察し、損傷歯髄の治癒反応に関与することを示唆した。

これらの結果は、歯髄の損傷時に現れる特徴的な分子像を示すものであり、ポストゲノム時代の歯内療法に新しい概念を導くことに役立つと思われる。

従って、本申請論文は学位論文としての価値を有すると認めた。