

論文の内容の要旨

氏名：横井 絵理

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Enamel defects in the *Alpl*^{-/-} murine model of infantile hypophosphatasia
(乳児型低ホスファターゼ症の *Alpl*^{-/-}モデルマウスにおけるエナメル質異常)

低ホスファターゼ症 (Hypophosphatasia: HPP) は組織非特異型アルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney: *ALPL*) の変異による遺伝子疾患である。HPP は血清中のアルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase: ALP) 活性の低下や骨や歯などの硬組織石灰化障害が特徴である。全身の骨の石灰化が障害され出生直後に死亡する重篤な周産期型から、症状が歯のみに限局した軽症のオドント型まで様々な病型が知られている。歯科的症状は、乳歯の早期脱落を始め、歯槽骨減少や歯髄腔の拡大、エナメル質、象牙質、セメント質の異常などが報告されている。

ALPL 遺伝子の変異がどのような機序で骨格の石灰化不全や歯の脱落として症状が現れているのかを解明するために、ノックアウトマウスを用いた研究が報告されている。*Alpl* 遺伝子ノックアウトマウス (*Alpl*^{-/-}) は、成長障害とピリドキサル酸の代謝異常による痙攣を発症し、生後 2 週間前後で死亡するため、乳児型 HPP モデルと考えられている。*Alpl*^{-/-}マウスを用いた過去の報告において、乳歯の早期脱落の原因や象牙質、セメント質の異常については多くの報告があるが、エナメル質についての研究報告は少ない。*Alpl*^{-/-}マウスにおけるエナメル質異常については、エナメル質の非薄や小柱構造の乱れが報告されているが、このような形態異常の原因は未だ解明されていない。

そこで、本研究ではエナメル質の形成において *Alpl* の欠損が及ぼす影響を *Alpl*^{-/-}マウスを用いて解明することを目的とし、*Alpl* 遺伝子を有する対照マウス (*Alpl*^{+/+}) と *Alpl*^{-/-}マウスの比較、検討を行った。なお、本研究で用いたすべてのマウスは genotyping を行い、選別した。まず、生後 8 日齢のマウス歯髄培養細胞を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。続いて、生後 5 日齢マウスを用いてヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色、ALP 活性染色、免疫組織学 (IHC) 染色を行い、下顎右側第一臼歯 (M1) の組織学的検討を行った。IHC 染色では、マイクロアレイ解析の結果から注目したアメロジェニン (AMELX)、アメロブラスチン (AMBN)、エナメルリン (ENAM) のタンパク質の局在の確認を行った。また、これらの 3 つの遺伝子について mRNA 発現量を比較するために、生後 5 日齢マウス M1 を用いてリアルタイム PCR (qPCR) により遺伝子発現解析を行った。

本研究により、以下の結果を得た。

- 1) マイクロアレイ解析の結果、*Alpl*^{+/+}マウスと比較して *Alpl*^{-/-}マウスの *Alpl* 遺伝子の発現比率は log2 比率で全遺伝子中、最も低下していた。また、歯の発生に関連した遺伝子を選定し、*Alpl*^{+/+}マウスより *Alpl*^{-/-}マウスの発現比率が 2 倍以上低い値の遺伝子を抽出したところ、エナメルマトリックスタンパク質の遺伝子 (*Ame1x*, *Ambn*, *Enam*) で 2 倍以上の低下を認めた。
- 2) H&E 切片観察の結果、生後 5 日齢の *Alpl*^{+/+}と *Alpl*^{-/-}マウスの M1 はともに鐘状期後期であり、外形に大きな違いは認められなかった。拡大像では、*Alpl*^{+/+}マウスと比べ *Alpl*^{-/-}マウスのエナメル質の厚さは薄く、エナメル芽細胞の形態異常や一部のエナメル質欠損、エナメル質層の凹凸構造を認めた。
- 3) ALP 活性染色の結果、*Alpl*^{+/+}マウスでは、歯槽骨や M1 における星状網細胞、中間層細胞、象牙芽細胞および歯髄細胞などに活性を認めたが、*Alpl*^{-/-}マウスには活性が認められなかった。
- 4) IHC 染色の結果、AMELX、AMBN、ENAM のいずれにおいても *Alpl*^{+/+}マウスと比較し *Alpl*^{-/-}マウスにおける染色性の違いを認めた。
- 5) qPCR による *Ame1x*, *Ambn*, *Enam* の mRNA 発現定量的結果、*Alpl*^{+/+}マウスと比較し、*Ambn*, *Enam* では発現低下について統計学的有意差が認められた。

以上の結果から、鐘状期 M1 において、*Alpl* 遺伝子の欠損により *Ambn*, *Enam* の mRNA 発現が低下し、エナメル芽細胞の形態異常が引き起こされ、エナメルマトリックスタンパク質 (AMELX, AMBN, ENAM) の局在の乱れやエナメル質の形態異常を引き起こした可能性が示唆された。本研究結果はヒトにおける HPP のエナメル質異常の原因解明の一助になると考えられた。