

論文審査の結果の要旨

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)

審査委員：(主査) 教授 平塚 浩一
(副査) 教授 岡田 裕之
教授 清水 武彦

近年、日本の小児慢性特定疾患及び難病指定をされた低ホスファターゼ症 (Hypophosphatasia: HPP) は先天性の代謝異常により硬組織石灰化異常をきたす遺伝性疾患である。原因は、組織非特異型アルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney: *ALPL*) の遺伝子の変異であり、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。HPP は病態やその発症時期により分類され、全身の骨の石灰化が障害され出生直後に死に至る重篤な周産期型から、症状が歯牙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。歯科的症状として、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。これらの病態に対する原因解明のため、乳児型 HPP モデルである *Alpl* 遺伝子ノックアウトマウス (*Alpl*^{-/-}) を用いた研究が広く行われている。*Alpl*^{-/-}マウスを用いた過去の研究報告において、乳歯の早期脱落や象牙質、セメント質の異常についての報告は多いが、エナメル質についての研究報告は少ないのが現状である。これまで、*Alpl*^{-/-}マウスにおけるエナメル質が非薄なことや小柱構造に乱れがあること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た。

Alpl 遺伝子を有する対照マウス (*Alpl*^{+/+}) と *Alpl*^{-/-}マウスを以下の方法を用いて比較、検討した。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。

その結果、

- 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 発現定量の結果、*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新たな知見を得たものであり、今後の歯科医学ならびに小児歯科学の発展に大きく寄与するものと思われる。

よって本論文の著者は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成29年2月23日