

審査の結果の要旨

小宮山 雄介

本研究は、再生の困難な歯周組織において、歯周組織の構成要素である歯周靭帯に特に着目し、その形成過程において発現が認められる分子を同定し、生理学的なマーカーとして組織再生療法の開発に貢献するために基礎的な検討を試みたものである。この生理学的なマーカーの候補として、腱や靭帯をはじめとする強靭結合組織において発生後期に特徴的な発現を示す **Tenomodulin (Tnmd)** をあげている。歯周組織における発現とその機能を明らかにするために、*in vitro* での **Tnmd** 遺伝子導入系および **Tnmd** ノックアウトマウス (**Tnmd**^{-/-}マウス) を用いた組織学的な検討を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. **Tnmd** の発現を免疫組織化学的に検索するために、先行研究で示された潜在的酵素切断配列の前後に抗原認識部位を設定した、**Anti-Tnmd BC**、および **Anti-Tnmd CTD** 抗体の作製を試みた。作製抗体の特異性は、**Tnmd** を発現していない **NIH3T3** 細胞株に対して **Tnmd**、または **FLAG** 融合 **Tnmd** 遺伝子導入を行い、の特異性をウエスタンブロット法にて示した。また、糖鎖修飾阻害剤である **Tunicamycin**、および選択的な **N-Glycan** 切断酵素である **PNGaseF** を用いた検討から、**Tnmd** には 2 つの糖鎖が修飾されることを示した。さらに、**Tnmd**^{-/-}マウスおよび同腹仔の野生型マウス (+/+マウス) に由来する腱組織と **Tnmd** 特異抗体を用いて免疫組織化学的に検討し、抗体の特異性を示した。
2. **NIH3T3** 細胞に **Tnmd** 遺伝子導入し、**Tnmd** の細胞内局在の検討した。細胞分画法とウエスタンブロット法により **Tnmd** の発現を検討したところ、膜成分、細胞骨格成分に **Tnmd** 特異的なバンドを示した。膜成分では、**46kDa**、**42kDa** の二つのバンドを検出し、細胞骨格分画

では 46kDa のバンドのみを検出した。より詳細な検討として、Tnmd 遺伝子導入した NIH3T3 細胞における、Tnmd 細胞内局在を免疫細胞化学により検討を試みた。その結果、細胞の原形質膜に局在する Pan-Cadherin、細胞膜とゴルジ体を描出する WGA (Wheat germ agglutinin)、さらに微小管を構成する Tubulin との共局在を示した。以上から、細胞内では Tnmd が細胞の原形質膜を中心に局在していることを明らかにした。また、細胞骨格と関連して局在する可能性を示した。

3. マウス下顎切歯を含む組織で歯周組織における Tnmd 発現を検討し、歯周靭帯の線維芽細胞、歯髄中の象牙芽細胞、骨膜中の細胞に Tnmd の発現を示した。マウス切歯は生涯萌出し続けることから、よりヒトに近い萌出様式を取る臼歯部で Tnmd 発現時期を検討した。その結果、歯が未萌出の生後 2 週齢では発現を認めず、咬合開始時期の 3 週齢で Tnmd の発現が認められることを示した。この歯周靭帯中の Tnmd 発現は、咬合が確立する 4 週齢の時期でも維持されていることを示した。以上より Tnmd は、歯が萌出した後の咬合開始時期に発現が起こることを示した。
4. NIH3T3 細胞に Tnmd 遺伝子を導入した時の細胞形態への影響を検討し、Tnmd 遺伝子導入により細胞面積、細胞周径が増加し、多数の細胞突起の伸長がみられることから、細胞形態に影響をおよぼすことを示した。また、細胞形態が細胞接着と密接に関係していることから、Tnmd 導入により細胞接着が増強される可能性を定量的な接着アッセイにより評価を試みた。その結果、Tnmd 遺伝子導入によりコントロールとした β Galactosidase 遺伝子導入細胞と比較して細胞接着が増強されることを示した。より詳細に Tnmd による細胞接着効果を検討するために Tnmd の細胞外ドメイン欠損変異体を作製し検討した。その結果、CTD は細胞接着を抑制的に、CS 領域および BRICHOS ドメインが細胞接着を促進的に制御することを示した。
5. Tnmd^{-/-}マウスの強靭結合組織に由来するプライマリー細胞を用いた検討により、Tnmd^{-/-}細

胞は同腹仔の+/+マウス由来細胞と比較して、Collagen、Fibronectin の細胞外マトリクスに対する細胞接着が現象することを示した。このことにより Tnmd の細胞接着機能への関与を明確にした。

6. Tnmd の細胞接着への関与が頭頸部硬組織の形態に与える影響を Tnmd^{-/-}マウスおよび同腹仔の+/+マウスで MicroCT により検討した。その結果、Tnmd^{-/-}マウスでは同腹仔の+/+マウスと形態や数的な変化を認めないことを示した。

以上、本研究では Tnmd 遺伝子導入系および Tnmd^{-/-}マウスを用いた検討から、Tnmd の歯周靭帯における発現が咬合開始時期に起こることを明らかにし、歯周組織の中でも歯周靭帯の発達を特徴づける分子であることを明らかにした。さらに、Tnmd が重要な細胞高次機能である細胞接着に関与することを明らかにした。本研究は、発生学的知見が乏しい歯周組織を含む強靭結合組織の発生・発達機構や、強靭結合組織の恒常性維持機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。