

学 位 論 文 題 名

Different expressions of connexin 43 and 32
in the fibroblasts of human dental pulp

(ヒト歯髄線維芽細胞における connexin43と32の発現の相違)

学位論文内容の要旨

細胞間連結装置の1つである Gap junction (Gj) は、隣接する2つの細胞の細胞膜を貫通する直径約 1.5 nm の微小なチャネルであり、無機イオンやセカンドメッセンジャーなど、分子量約 1,000 Da 以下の水溶性分子を通過させることにより、隣接細胞間における電氣的・化学的な共役と情報の共有を可能とするための装置である。Gj の基本構成単位は膜貫通型タンパクである Connexin (Cx) であり、それぞれの細胞膜上で6個の Cx が環状に集合して Connexon というチャネル構造をつくり、この Connexon が対になることによって隣接細胞間にチャネルが形成される。ヒトの Cx については現在 (実験開始時) までに 15 種類が知られており、細胞・組織により Gj を構成する Cx の種類が異なることが報告されている。また、培養細胞を用いた遺伝子導入実験から、Gj の透過性はこれを構成する Cx の種類によって異なることが確認されている。そのため、Cx の種類と細胞の機能は密接に関連している可能性が強く示唆されている。

一方、歯髄は象牙質形成、栄養、知覚、防御などに寄与しているが、その歯髄の中で最も優勢な細胞は線維芽細胞である。歯髄線維芽細胞は歯髄の正常なホメオスタシスを維持するために種々のタンパクを産生する。また、細胞稠密層の線維芽細胞は適切な刺激の下で象牙芽細胞に分化することが知られている。したがって、歯髄線維芽細胞はこれら多くの異なった機能を果たすために、これらの機能に関連した複数の Cx を発現する可能性があると考えられる。しかし、歯髄線維芽細胞における Cx の発現に関する研究は少なく、特にヒトでは全く行われていない。そこで本研究では、ヒト歯髄組織ならびに培養ヒト歯髄線維芽細胞を用いて、歯髄線維芽細胞における Cx の発現を検索した。

本学歯学部附属病院において智歯周囲炎により抜去されたう蝕のないヒト第3大臼歯

を用い、抜歯後ただちに歯牙を分割して歯髄組織を摘出した。サンプルの一部は歯髄摘出後、OCT コンパウンドに包埋・凍結し、クリオスタットで 10 μ m の凍結連続組織切片を作成した。また、残りのサンプルは歯髄線維芽細胞の分離・培養に用い、第 2 継代細胞を滅菌カバーガラスの置かれた 6 ウェルプレートの中で 3 日間培養し、およそ 70 %コンフルエントになった第 3 継代細胞を実験に使用した。

歯髄組織切片と培養歯髄線維芽細胞の両者について、実験開始時に市販されていた 8 種類の抗 Cx 抗体 (Cx26, Cx30, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx50) を用い、通法に従って免疫染色を施して落射蛍光顕微鏡で観察するとともに、Western blotting を行ってヒト歯髄線維芽細胞における Cx の発現を検索した。

歯髄組織切片における免疫染色の結果、発現が観察された Cx は Cx43, Cx32, および Cx26 の 3 種類のみであった。このうち、Cx43 については細胞稠密層での発現が他の部位よりもやや弱いものの、歯髄組織全体で発現がみられた。また Cx32 については Cx43 と同様に歯髄組織全体で発現がみられたが、特に細胞稠密層直下の領域においてベルト状の強い発現が認められた。これに対して Cx26 の発現は歯髄組織全体にはみられず、細胞稠密層と固有歯髄において束状の発現が散在して観察された。この Cx26 の発現パターンは隣接切片における CD56 (神経組織に発現) の発現パターンと同様であったことから、Cx26 を発現しているのは線維芽細胞ではなく神経組織であると考えられた。なお、Cx32 が強く発現していた細胞稠密層直下の領域と Cx26 および CD56 が発現していた領域とは、隣接切片間での比較で明らかに異なっていたことから、細胞稠密層直下の領域における Cx32 のベルト状の強い発現は神経組織によるものではないことが確認された。

一方、培養ヒト歯髄線維芽細胞の免疫染色の結果では、Cx43 と Cx32 については核以外の領域でそれぞれの Cx の発現が確認されたが、Cx26 については全く発現がみられなかった。また Western blotting による分析においても、Cx43 については分子量 43 kDa の部位に、Cx32 については分子量 27 kDa の部位に、それぞれ単一のバンドが明瞭に認められたが、Cx26 については、存在すれば認められるはずの分子量 26.5 kDa の部位にバンドはみられなかった。

以上の結果から、ヒト歯髄には今回検索した 8 種類の Cx のうち、Cx43, Cx32, お

よびCx26の3種類のCxが発現するが、Cx26を発現するのは神経組織であり、ヒト歯髄線維芽細胞が発現するCxはCx43とCx32の2種類のみであることが明らかとなった。このことは、ヒト歯髄線維芽細胞には少なくともCx43とCx32の2種類のCxによって構成されるGjが存在することを示唆している。またCxの種類によってGjの透過性が異なること、およびこの透過性の違いが細胞の機能と密接に関連していると考えられていることから、ヒト歯髄線維芽細胞はCx43とCx32に依存する異なる機能を有している可能性が考えられた。

一方、細胞稠密層直下の領域においてベルト状に認められるCx32の強い発現は、この領域の線維芽細胞が他の領域の線維芽細胞とは異なる機能、例えば外来刺激に対する歯髄組織のバリアーとしての機能、あるいは細胞稠密層に存在する線維芽細胞を象牙芽細胞へと分化誘導する機能などを有している可能性を強く示唆している。しかしながら、本研究およびその後の追加実験においても、この細胞稠密層直下の領域においてベルト状に認められるCx32の強い発現がどのような役割を果たしているかを明らかにすることができていない。これについては今後も引き続き多方面から検索する必要があると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 崎 貴 生

副 査 教 授 脇 田 稔

副 査 教 授 吉 田 重 光

学 位 論 文 題 名

Different expressions of connexin 43 and 32 in the fibroblasts of human dental pulp

(ヒト歯髄線維芽細胞における connexin43と32の発現の相違)

審査は、吉田、脇田、および川崎審査委員により行われ、論文提出者に対し提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問によって行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文提出者は、Gap junction 関連タンパクである Connexin (以下 Cx)のヒト歯髄線維芽細胞における発現と局在について組織化学的実験法を用いて検索し、検討している。

智歯周囲炎により抜歯されたう蝕のないヒト第三大臼歯を10サンプル使用した。抜歯直後に歯髄組織を摘出し、7サンプルからは 10 μm の凍結連続組織切片を作製し、残りの3サンプルからは線維芽細胞を分離・培養し、実験には第3継代細胞を用いた。組織切片と培養歯髄線維芽細胞についてこの時点で市販されていた抗 Cx 抗体 8 種類を用いて免疫染色を行った。また末梢の有髄神経線維はいくつかの Cx を発現することが知られているので、組織切片上の Cx の発現が歯髄線維芽細胞によるものなのか神経線維によるものかを区別するために組織切片については抗 CD56 抗体を用いた免疫染色も行った。さらに免疫染色を施した培養歯髄線維芽細胞と同一サンプルを用いてウエスタンブロッティングを行った。

今回検索した 8 種類の Cx のうち、歯髄組織切片における免疫染色では Cx43, 32 および 26 の 3 種類の発現が観察された。Cx43 の免疫染色では歯髄組織全体で発現がみられたが、細胞稠密層では発現がやや弱く観察された。Cx32 の免疫染色でも歯髄組織全体で発現がみられたが、細胞稠密層よりわずかに内側では特に強い発現が帯状に観察された。Cx26 の免疫染色では歯髄組織全体に発現が見られず、象牙芽細胞下層と固有歯髄にて束状に発現がみられた。CD56 の免疫染色では象牙芽細胞下層(ラシュコフの神経叢)と固有歯髄で束状の発現がみられ、Cx26 の発現パターンはこの CD56 の発現パターンと酷似していた。したがって、Cx26 が発現していたのは線維が細胞によるものではなく、神経線維による

可能性が考えられる。また Cx32 が強く発現していた部位と象牙芽細胞下層で CD56 が発現していた部位は明らかに異なるので、Cx32 が強く発現していたのはラシュコフの神経叢によるものではないことが確認された。培養細胞における免疫染色では8種類の Cx のうち Cx43 と Cx32 の発現が観察されたが、Cx26 の発現は観察されなかった。さらにウエスタンブロッティングにおいては Cx43 と Cx32 はそれぞれ分子量である 43kDa, 27kDa の部位に単一のバンドが見られたが、Cx26 は分子量 26.5kDa の部位にバンドはみられなかった。

これらの結果より以下のようにまとめている。

- 1) ヒト歯髄線維芽細胞は Cx43 と Cx32 を発現することが明らかになった。このことは歯髄線維芽細胞には Cx43 と Cx32 によって構成される Gap junction が形成されている可能性を示唆している。
- 2) Cx の種類と細胞、組織の機能とは密接に関連していると考えられていることから、歯髄線維芽細胞は Cx43 と Cx32 に依存する異なる機能を有している可能性が考えられた。
- 3) Cx32 の細胞稠密層直下における強い発現は、この領域に存在する線維芽細胞が特別な機能を果たしている可能性があると考えられた。

次いで、本論文提出者に対して本研究領域に関連のある質問が行われたが、これらの質問に対してそれぞれ適切な回答が得られた。また本研究は歯髄における Gap junction 関連タンパクの存在を解明し、その局在に関しては興味深い結果を得ている。本論文提出者は、Gap junction 関連タンパクの歯髄における局在と細胞機能との関連性を追究する実験も進めており、将来の展望も評価された。本論文は歯髄における細胞間接着装置を主たる研究課題とするものであったが、これらの領域の学識も十分であると共に、将来の研究方向についての展望も、研究の発展を期待できるものであった。以上のことから、論文提出者の学識は、博士(歯学)に値するものと判断し、主査ならびに副査は論文提出者を合格と判定した。