

学位論文題名

# Type XVII Collagen Is a Key Player in Tooth Enamel Formation

(XVII型コラーゲンは、歯牙エナメル質形成に重要な役割を果たす)

## 学位論文内容の要旨

### 【目的】

非 Herlitz 型接合部型表皮水疱症は全身に水疱を形成し、脱毛、爪の変形などに加え、エナメル質形成不全を発症する常染色体劣性の遺伝性疾患である。本研究では、同症でのエナメル質形成不全の機序を解明し、原因遺伝子である 17 型コラーゲン (COL17) の歯牙形成における役割について検討を行った。

### 【材料及び方法】

我々の作成した同症のモデル動物である COL17KO マウス (KO) およびヒト COL17 を KO にトランスジェニックした COL17<sup>h+/+, m-/-</sup> マウス (COL17 ヒト化マウス) を用いて、野生型 (WT) と比較しながら、切歯および臼歯エナメル質の形成機序を形態学および発生学的に検討した。

### 【結果と考察】

まず、マウス歯胚中での COL17 の発現を確認するため、切歯歯根のエナメル器および初代培養エナメル芽細胞より、mRNA を抽出し、RT-PCR 法を施行した。WT では、エナメル器および培養細胞の両者において COL17 の発現を認めたが、KO では両者ともに消失していた。そこで、歯牙形成過程における COL17 の発現の時期を確認するために上顎切歯凍結切片における免疫組織染色を施行した。エナメル質形成の主要な 3 つのステージ (分泌前期、分泌期、成熟期) 全てに COL17 の発現が確認されたが、エナメル芽細胞と象牙芽細胞間に存在する基底膜が消失する分泌期での COL17 の発現は、他の時期よりも低下していた。さらに、COL17 が構成要素であるヘミデスモゾームの歯胚基底膜中での形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したところ、KO のヘミデスモゾームは WT と比較して低形成である様子が確認された。

以上より、歯牙形成における COL17 の関与が示されたことより、KO の歯牙形態をより詳細に観察していくこととした。

萌出した歯牙を実体顕微鏡で観察すると、KO では嚙歯類に特有に認められる切歯エナメル質の色素沈着の低下と白濁が観察された。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて表面構造の観察を行ったが、明らかな形態異常やヒトで認められるようなエナメル質欠損に伴う小窩は認められなかった。一方、臼歯を SEM で観察すると、同週令の WT 群と比較して、KO 群で明らかな咬耗の進行が観察された。

次に、エナメル質の構造を比較するため、切歯エナメル質の縦断切片を作成し、酸処理後に SEM にて観察を行った。エナメル質の厚みには WT-KO 間で明らかな差は認められなかったが、エナメル質の基本構造であるエナメル小柱形態が不明瞭であり、その配列の規則性が乱れている様子が観察された。一方、COL17 ヒト化マウスでは小柱構造が改善しており、COL17 とエナメル小柱の配列との関係が示唆された。

また、走査型分析電子顕微鏡 (SEM-EDX) を用いて、切歯エナメル表層および縦断での各元素分布状態を比較したところ、歯牙主成分である Ca、P 分布に差を認めないものの、切歯の色素沈着の原因とされている Fe については、分布範囲のばらつきや分量の低下が KO にて観察された。

上顎切歯を矢状断で厚さ 100  $\mu$ m まで研磨し、高解像度の X 線フィルム上で軟 X 線撮影を行う contact microradiography を用いて、エナメル質の石灰化過程を比較した。KO では WT と比較して、初期の石灰化が不均一であり、ある程度均一にエナメル質が石灰化する時期も切縁側に移動しており、石灰化の遅延が示唆された。

形成されたエナメル質の種々の異常が確認されたことから、その形成過程をより詳細に把握するため、光学顕微鏡および TEM にて観察を行った。発生初期である分泌前期では WT-KO 間において、明らかな差は確認できなかったが、発生中期の分泌期において、HE 染色下で KO のエナメル芽細胞が伸張するトームス突起 (TP) の形態が WT と比較して不明瞭である様子が観察された。そこで、TEM にて TP の形態を観察すると、WT の TP が三角錐様の規則的な形態を有しているのに対し、KO では馬尾様の不規則で低形成な TP が観察された。発生後期の成熟期では、エナメル芽細胞の形態には、明らかな異常は観察されなかったが、TP より分泌されたエナメル基質の電子密度が KO では低下しており、WT で観察されるようなエナメル小柱の配列も KO では観察されなかった。

ここで、KO でのエナメル芽細胞の形態異常が観察されたことから、その機能についてもさらに検討を行った。

エナメル芽細胞の細胞増殖能を比較するため、マウス切歯周囲のエナメル器から前エナメル芽細胞を初代培養してコロニー形成能を比較したが、その増殖能には WT-KO 間で明らかな差は認められなかった。

また、TUNEL 法により、エナメル芽細胞のアポトーシスの異常の有無を確認したが、通常分泌期から成熟期の移行時期に高頻度に確認されるエナメル芽細胞のアポトーシスには、明らかな差は認められなかった。

次に、マウス切歯より採取した前エナメル芽細胞を上皮前駆細胞培養用培地にて培養後、エナメル芽細胞への分化マーカーとして有効な Amelogenin および Ameloblastin に対する免疫蛍光抗体法を行ったところ、2 種のマーカーとも WT、KO で発現が認められたものの、KO での発現が低下していることが示された。

そこで、切歯エナメル器および初代培養エナメル芽細胞から mRNA を採取し、主要なエナメル蛋白であり、エナメル芽細胞分化マーカーとも考えられる Amelogenin、Ameloblastin、Enamelin、Tuftelin、Enamelysin、Dentin sialophosphoprotein を対象にして Real-time PCR を行い、各種マーカーの発現の比較を行った。

切歯エナメル器では、Tuftelin 以外の全エナメル蛋白 mRNA の発現の低下が KO で確認された。一方、培養細胞では、上皮単独培養であり、分化条件が不十分であったためか、WT においても、

Amelogenin、Ameloblastin、Enamelin、Tuftelin しか発現が観察されず、エナメル芽細胞の分化後期（分泌期から成熟期）に発現が通常認められる Enamelysin、Dentin sialophosphoprotein の発現は認められなかった。発現を認めたタンパクの中で、主要なエナメルタンパクである Amelogenin、Ameloblastin、Enamelin が KO では著しく低下しているのに対し、Tuftelin のみ KO での増加を認めた。Tuftelin はエナメル芽細胞の分化の初期に発現するとされていることから、KO のエナメル芽細胞は前エナメル芽細胞からの分化の停滞が生じている可能性が示唆された。

#### 【結論】

KO 歯牙では、歯胚基底膜の構造の異常が、歯原性上皮細胞からエナメル芽細胞への分化（特に TP の形成）に障害を起こすと思われる。これより、エナメル基質の分泌異常が生じるため、成熟度が低く、立体構造的にも欠陥のあるエナメル質が形成されると推測された。また、COL17 が上皮-間葉相互作用に関与し、エナメル芽細胞の分化の制御に重要な役割を果たすことが考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政  
副 査 教 授 土 門 卓 文  
副 査 教 授 進 藤 正 信  
副 査 准教授 秋 山 真 志 (医学研究科)

学 位 論 文 題 名

## Type XVII Collagen Is a Key Player in Tooth Enamel Formation

(XVII型コラーゲンは、歯牙エナメル質形成に重要な役割を果たす)

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

接合部型表皮水疱症は全身に水疱を形成し、脱毛、爪の変形などに加え、エナメル質形成不全を発症する常染色体劣性の遺伝性疾患である。本研究では、同症でのエナメル質形成不全の機序を解明し、原因遺伝子である 17 型コラーゲン(COL17)の歯牙形成における役割について検討を行った。

我々の作成した同症のモデル動物である COL17KO マウス(KO)およびヒト COL17 を KO にトランスジェニックしたCOL17h+/+, m-/-マウス(COL17ヒト化マウス)を用いて、野生型(WT)と比較しながら、エナメル質の形成機序を形態学および発生学的に検討した。

まず、歯牙での COL17 の発現を確認するため、切歯エナメル器および初代培養エナメル芽細胞(Am)より、mRNAを抽出し、RT-PCR 法を施行した。WT では、双方に COL17 の発現を認めたが、KO では消失していた。そこで、COL17 の発現時期を確認するために免疫組織染色を施行したところ、WT のエナメル質形成の全過程で COL17 の発現が確認された。さらに、歯胚基底膜中のヘミデスモゾームを透過型電子顕微鏡(TEM)で観察したところ、KO のヘミデスモゾームは低形成であった。

次に歯牙を実体顕微鏡で観察すると、KO では嚙歯類に特有の切歯エナメル質の色素沈着の低下と白濁が観察された。さらに、走査型電子顕微鏡(SEM)にて表面構造を観察したが、ヒトのようなエナメル質欠損に伴う小窩は認められなかった。一方、臼歯を SEM で観察すると、同週令の WT と比較して、KO で咬耗の進行が観察された。

さらに SEM にてエナメル質立体構造を観察したところ、KO のエナメル小柱形態が不明瞭であり、その配列の規則性が乱れていた。一方、COL17ヒト化マウスでは小柱構造が改善しており、COL17とエナメル小柱の配列との関係が示唆された。

また、走査型分析電子顕微鏡(SEM-EDX)を用いて、エナメル表層および縦断での元素分布状態を比

較したところ、Ca、P 分布に差を認めないものの、色素沈着の原因とされる Fe については、分布範囲のばらつきや分量の低下が KO にて観察された。

コタンタクトマイクロラジオグラフィにより、KO の初期の石灰化が不均一であり、石灰化の遅延が示唆する所見が得られた。

以上より、エナメル質の形成過程を光学顕微鏡および TEM にて詳細に観察した。分泌前期では明らかな差は確認できなかったが、分泌期では、HE 染色下にて、KO のトームス突起(TP)の形態が WT と比較して不明瞭である様子が観察された。TEM では、WT の TP が三角錐様の規則的な形態を有しているのに対し、KO ではひだ状の低形成な TP が観察された。成熟期では、TP より分泌されたエナメル基質の電子密度が KO で低下しており、エナメル小柱の配列も不明瞭であった。

さらにマウス切歯の歯原性上皮細胞を初代培養してコロニー形成能を比較したが、その増殖能には明らかな差は認められなかった。

次に、初代培養した歯原性上皮細胞を Am へと分化誘導し、Am の代表的分化マーカーである Amelogenin および Ameloblastin に対する免疫蛍光抗体法を行ったところ、KO での発現が低下していることが示された。そこで、エナメル器および初代培養 Am から mRNA を採取し、主要なエナメル蛋白である Amelogenin、Ameloblastin、Enamelin、Tuftelin、Enamelysin、Dentin sialophosphoprotein を対象にして Real-time PCR を行った。

エナメル器では、ほぼ全てのエナメル蛋白 mRNA の発現の低下が KO で確認された。一方、培養細胞では、分化条件が不十分であったためか、WT においても、Amelogenin、Ameloblastin、Enamelin、Tuftelin しか発現が観察されず、Am の分化後期に発現する Enamelysin、Dentin sialophosphoprotein は認められなかった。発現を認めたタンパクの中で、Amelogenin、Ameloblastin、Enamelin が KO にて著しく低下しているのに対し、Tuftelin のみ KO で増加を認めた。Tuftelin は Am の分化の初期に発現することから、KO では Am への分化の停滞が生じている可能性が示唆された。

KO 歯牙では、歯胚基底膜の構造の異常が、歯原性上皮細胞から Am への分化(特に TP の形成)に障害を起こすと思われる。これより、エナメル基質の分泌異常が生じるため、成熟度が低く、立体構造的にも欠陥のあるエナメル質が形成されると推測された。また、COL17 が上皮-間葉相互作用に関与し、Am の分化の制御に重要な役割を果たすことが考えられた。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。主な質問事項は、1)Hetro マウスでの発現系、2)基底膜が消失する分泌期での COL17 の発現とその役割、3)象牙質での異常、4)上皮系である腺組織での COL17 の発現、5)Laminin5 との関係等であった。これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、接合部型表皮水疱症でのエナメル質形成不全発症機構の解明と上皮間葉相互作用における COL17 の役割の仮説を示したものであり、その内容が高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、さらに発展的研究へのモチベーションも高く将来性についても評価された。本研究業績は病態解明のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士(歯学)の学位に値するものと認められた。