

学位論文題名

Type VII collagen deficiency causes defective tooth
enamel formation due to poor differentiation of
ameloblasts

(7型コラーゲン欠損はエナメル芽細胞分化障害によるエナメル質形成不全
を引き起こす)

学位論文内容の要旨

皮膚、毛、歯など上皮系組織の発生においては上皮間葉相互作用が働いている。上皮間葉相互作用に関与する多数の分子が報告されているが、その中でも、表皮基底膜部に存在する 17 型コラーゲン(COL17)の欠損によりエナメル質形成不全が発症し COL17 が上皮間葉相互作用に関与している可能性があることが報告されている。基底膜部に存在する他の分子も上皮間葉相互作用に関与している可能性が示唆され、基底膜部に存在する分子の欠損マウスの歯の形成を調べることは重要であると考えた。

劣性栄養障害型表皮水疱症は出生時に発症し、四肢、体幹に多数の水疱、びらんを形成し、頭髮の脱落、爪の形成異常に加え、食道狭窄や口腔粘膜びらんなどの粘膜障害がみられる常染色体劣性の遺伝性疾患である。繰り返し起こる水疱形成および癒痕治癒により手指、足指は癒着し棍棒状を呈することがある。表皮基底膜部に存在する anchoring fibril の構成分子である 7 型コラーゲン(COL7)をコードする遺伝子の変異により anchoring fibril の欠損が起こり、表皮下に水疱が形成される。本症患者の歯には高頻度にう蝕がみられ、エナメル質形成不全が疑われている。本研究では、本症でのエナメル質形成障害の発症機序を解析し、原因分子である COL7 が歯の形成において果たす役割について検討を行った。

試料として、本症患者の抜去歯、本症のモデル動物である COL7 ノックアウト・マウス (*Col7^{-/-}*)と野生型マウス (*Col7^{+/+}*)の歯を用いた。患者の抜去歯については、実体顕微鏡でエナメル質表面の観察を行うとともに、研磨標本を作製し、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡 (SEM)を用いてエナメル質横断像の観察を行った。マウスの歯については、実体顕微鏡でエナメル質表面の観察を行うとともに、SEM でエナメル質表面、エナメル質横断像の微細構造の観察を行った。走査型分析電子顕微鏡 (SEM-EDX)、Micro CT で、エナメル質の構成元素分析、石灰化度の測定を行った。光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡 (TEM)で、歯の形成の 3 ステージ(分泌前期、分泌期、成熟期)の観察を行った。また、免疫組織化学を用いて歯胚における COL7 の存

在部位の観察、RT-PCR 法を用いて歯胚および初代培養エナメル芽細胞における COL7 の mRNA 発現の確認、歯胚および初代培養エナメル芽細胞におけるエナメルタンパク(アメロゲニン、アメロブラスチン、エナメルリン、タフテリン、エナメライシン、DSPP)の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。

本研究の対象となった患者は 9 歳、女兒、COL7A1 に c.6574+1G>C および c.8109+2T>A の遺伝子変異を有していた。歯列不正の予防を目的に両側上下顎第一小臼歯の抜歯を行った。患者の抜去歯において、実体顕微鏡下ではエナメル質表面に広範な脱灰が認められたが、明らかなエナメル質形成不全は認められなかった。研磨標本作製し、エナメル質横断像を光学顕微鏡で観察した結果、健常人と比較して異常は認められなかったが、SEM で微細構造を観察したところ、患者ではエナメル小柱配列の規則性が乱れていることが確認された。

Col7^{-/-}マウスの切歯および臼歯に関しては、実体顕微鏡下では、歯の概形、エナメル質表面の色調および構造異常は認められなかった。SEM でも、エナメル質表面の微細構造の異常は認められず、同週令の Col7^{+/+}と比較して、Col7^{-/-}臼歯において咬耗の亢進は認められなかった。SEM-EDX では、エナメル質の元素分布状態を比較したところ、含有元素の種類やカルシウムおよびリン含有率に差は認められなかった。Micro CT では、切歯切縁部での CT 値に差は認められなかった。しかし、切歯エナメル質横断像を SEM で観察したところ、エナメル小柱配列の規則性が Col7^{-/-}では乱れていることが確認された。免疫組織化学では、Col7^{+/+}の歯胚基底膜部に COL7 が認められ、Col7^{-/-}での消失が観察された。また、歯胚基底膜部基板の構成分子である 4 型コラーゲンの免疫組織化学には、Col7^{+/+}、Col7^{-/-}ともに染色が観察された。

TEM では、歯の形成の 3 ステージ(分泌前期、分泌期、成熟期)の観察を行った。分泌前期では、Col7^{+/+}の歯胚基底膜部基板から弧状に伸びる anchoring fibril の存在が確認されたが、Col7^{-/-}の歯胚基底膜部には明らかな anchoring fibril は観察されなかった。分泌期では、エナメル芽細胞の大きさ、エナメル基質の厚さに差は観察されなかったが、Col7^{-/-}においてエナメル芽細胞のトームス突起の形態異常が観察された。Col7^{+/+}のトームス突起は三角形状を呈し規則正しく整列していたが、Col7^{-/-}のトームス突起は幅、長さにおいて Col7^{+/+}と比較して未発達であった。成熟期では、エナメル芽細胞の大きさ、細胞小器官の形態に差は観察されなかったが、Col7^{-/-}ではエナメル小柱の配列が乱れておりエナメル質は粗造であった。RT-PCR 法を用いた歯胚および初代培養エナメル芽細胞における COL7 の mRNA 発現を確認したところ、歯胚、培養細胞ともに Col7^{+/+}では COL7 の発現が確認されたが、Col7^{-/-}では確認されなかった。エナメルタンパクのリアルタイム PCR で mRNA 量を定量的に調べたところ、歯胚および初代培養エナメル芽細胞において主要なエナメルタンパクの mRNA 発現の低下が Col7^{-/-}で観察された。初代培養エナメル芽細胞の免疫組織化学では、

Col7^{+/+} の細胞質に顆粒状のアメロゲニンが観察されたが、*Col7^{-/-}* では観察されなかった。

以上の結果より、*Col7^{-/-}* では歯胚基底膜の構造異常により、歯原性上皮細胞からエナメル芽細胞への分化(特にトームス突起の形成)が障害され、エナメル基質の分泌異常が生じるため、立体構造に欠陥のあるエナメル質が形成されと考えられた。*Col7^{-/-}* 歯胚および初代培養エナメル芽細胞において主要なエナメルタンパクの発現の低下が観察されたが、エナメルタンパクはトームス突起から分泌されるため、トームス突起の形成障害によりエナメルタンパクの分泌が低下したと考えられた。表皮基底膜ヘミデスモゾームの構成分子である COL17 の欠損マウスでは、歯の色素沈着低下、石灰化不全、エナメル小柱の乱れ、トームス突起の形成障害、エナメルタンパクの発現低下が報告されている。COL7 欠損では歯の色素沈着低下、石灰化不全は観察されなかったが、COL17 と同様に、エナメル小柱の乱れ、トームス突起の形成障害が観察され、基底膜構成分子が歯の形成において重要な役割を果たしていると考えられた。以上より、COL7 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している可能性が考えられ、ヒト患者での観察結果と合わせて、劣性栄養障害型表皮水疱症患者では、エナメル質の立体構造は正常とは異なり、う蝕が進行しやすい可能性が示唆された。

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	網塚憲生
副査	教授	清水宏 (医学研究科)

学位論文題名

Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts

(7型コラーゲン欠損はエナメル芽細胞分化障害によるエナメル質形成不全を引き起こす)

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。

皮膚、毛、歯など上皮系組織の発生においては上皮間葉相互作用が働いている。上皮間葉相互作用に関与する多数の分子が報告されているが、その中でも、表皮基底膜部に存在する 17 型コラーゲン(COL17)の欠損によりエナメル質形成不全が発症し COL17 が上皮間葉相互作用に関与している可能性があることが報告されている。基底膜部に存在する他の分子も上皮間葉相互作用に関与している可能性が示唆され、基底膜部に存在する分子の欠損マウスの歯の形成を調べることは重要であると考えた。

劣性栄養障害型表皮水疱症は出生時に発症し、四肢、体幹に多数の水疱、びらんを形成し、頭髮の脱落、爪の形成異常に加え、食道狭窄や口腔粘膜びらんなどの粘膜障害がみられる常染色体劣性の遺伝性疾患である。本症患者の歯牙には高頻度でう蝕がみられエナメル質形成不全が疑われている。本研究では、本症でのエナメル質形成障害の発症機序を解析し、原因分子である 7 型コラーゲン(COL7)が歯の形成において果たす役割について検討を行った。

試料として、野生型マウス (*Col7^{+/+}*)、劣性栄養障害型表皮水疱症のモデル動物である COL7 ノックアウト・マウス (*Col7^{-/-}*)およびヒト COL7 を *Col7^{-/-}* にトランスジェニックした *COL7^{+/+,m/+}* マウス(COL7 ヒト化マウス)を用いて、実体顕微鏡、免疫組織化学、走査型電子顕微鏡 (SEM)、走査型分析電子顕微鏡 (SEM-EDX)、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いたマウス歯の組織学的検索を行い、エナメル器および初代培養エナメル芽細胞におけるエナメルタンパクの発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。

実体顕微鏡下では *Col7^{-/-}* 切歯および臼歯において、歯の概形およびエナメル質表面の異常は認められなかった。また、SEM でも、エナメル質表面の微細構造の異常は認められず、同週令の *Col7^{+/+}* と比較して、*Col7^{-/-}* 臼歯において咬耗の亢進は認められなかった。SEM-EDX では、エナメル質の元素分布状態を比較したところ、含有元素の種類やカルシウムおよびリン含有率に差は認められなかった。しかし、切歯エナメル質横断像を SEM で観察したところ、エナメル小柱配列の規則性が *Col7^{-/-}* では乱れていることが確認された。一方、COL7 ヒト化マウスでは小柱構造が改善しており、COL7 とエナメル小柱の配列との関係が示唆された。免疫組織化学では、*Col7^{+/+}* の歯胚基底膜中に COL7 が認められ、*Col7^{-/-}* での消失が観察された。TEM では、*Col7^{-/-}* の歯胚基底膜中の係留線維の欠損と、分泌期エナメル芽細胞のトームス突起の形態異常が観察された。リアルタイム PCR では、エナメル器および培養細胞において主要なエナメルタンパクの発現の低下が *Col7^{-/-}* で観察された。

以上の結果より、*Col7^{-/-}* では歯胚基底膜の構造の異常により、歯原生上皮細胞からエナメル芽細胞への分化（特にトームス突起の形成）が障害され、エナメル基質の分泌異常が生じるため、立体構造に欠陥のあるエナメル質が形成されると考えられた。COL7 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している可能性が考えられ、劣性栄養障害型表皮水疱症患者では、エナメル質の立体構造は正常とは異なり、う蝕が進行しやすい可能性が示唆された。

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)COL7 の構造および他の基底膜分子との関係性、2)同症患者の遺伝子変異内容、3)COL7 ヒト化マウスの作製方法、4)他組織での COL7 の発現、5)COL7, COL17 変異保因者でのエナメル質形成不全について等であった。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、劣性栄養障害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 COL7 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。