

学位論文題名

Altered distribution of extracellular matrix proteins in the periodontal ligament of periostin-deficient mice (ペリオスチン欠損マウス歯根膜における細胞外マトリックスタンパクの局在の変化)

学位論文内容の要旨

【緒言】

ペリオスチンは、マウス切歯においてクローニングされ、歯根膜と骨膜に主に局在する分子量 90kD の蛋白である。ペリオスチンが多量に発現する歯根膜、心臓弁、腱、骨膜は、力学的負荷を受ける部位であることから、ペリオスチンの機能としてメカニカルストレスとの関連が推測されてきた。また、ペリオスチンは EMI ドメインを介して I 型コラーゲンやファイブロネクチンと、また、fasI ドメインを介してテネイシン C と結合することが論じられており、メカニカルストレスに耐えうる巨大な細胞外マトリックス複合体の形成が示唆されている。一方、歯根膜はメカニカルストレスがかかる密性結合組織であり、そこにはペリオスチンをはじめ、多くの細胞外マトリックス蛋白が存在する。特に、齧歯類の切歯は絶えず萌出する常生歯であり、そのため歯根膜は、歯槽骨に結合している領域と歯に結合している領域の間にズレを生じる境界“shear zone”を形成することが報じられている。切歯の歯根膜は咬合力だけでなく、持続的な萌出に伴った歯根膜の基質線維や細胞の規則的な配列や細胞極性が誘導されており、そこにペリオスチンが関与する可能性は極めて高い。

そこで本研究では、ペリオスチン欠損マウスの切歯歯根膜における歯根膜線維芽細胞の配列・局在性、ならびに、I 型コラーゲン、ファイブロネクチン、テネイシン C といった細胞外マトリックスタンパクの局在性を検索することで、歯根膜におけるペリオスチンの作用を組織学的に解明することを目的とした。

【材料と方法】

生後 20 週齢の雄性野生型マウスとペリオスチン欠損マウス(各 6 匹ずつ)を用いた。麻酔下で 4% パラホルムアルデヒドを灌流固定し、下顎骨を摘出後、通法にてパラフィン包埋、または、エポキシ樹脂包埋を行った。パラフィン矢状断切片を作製し、切歯の切端から 4mm の領域(切端側)と第一臼歯遠心根直下の領域(臼歯側)の歯根膜における I 型コラーゲン、ファイブロネクチン、テネイシン C、MMP-1 (マウスは McolA, McolB), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), F4/80 (マウス単球・マクロファージのマーカー)の免疫染色を行った。また、エポキシ樹脂切片の矢状断超薄切片を作製し、タンニン酸・ウラン・鉛による電子染色を施して、透過型電子顕微鏡観察を行った。また、PCNA 免疫染色に関しては、切端

側と臼歯側において、歯根膜細胞全数に対する PCNA 陽性細胞数の割合を指標とし、Student t-test にて統計解析を行った。

【結果】

野生型マウスの切歯歯根膜では、切歯長軸方向に平行に走る基質線維からなるセメント質側領域と骨表面に垂直もしくは斜めに走る線維で構成される歯槽骨領域が明瞭に区別された。一方、ペリオスチン欠損マウスの切歯歯根膜では、その幅が肥厚化しており、そこには、不規則な走行を示す基質線維が認められ、歯槽骨側とセメント質側の境界は不明瞭であった。

野生型マウスでは、切端側および臼歯側ともに、I型コラーゲン、テネイシンC、ファイブロネクチンは歯根膜に一致して均一な局在を示した。しかしながら、ペリオスチン欠損マウスでは、切端側および臼歯側ともに、I型コラーゲンとファイブロネクチンは歯根膜線維芽細胞の周囲にやや強い斑点状の陽性反応を示したが、テネイシンCはほとんど認められず、歯槽骨側に僅かな陽性反応を示すのみであった。透過型電子顕微鏡にてコラーゲン線維を観察すると、野生型マウスでは、一定方向に配列する歯根膜線維芽細胞の間に束状のコラーゲン線維が層を形成していた。一方、ペリオスチン欠損マウスでは、束状のコラーゲン線維やその層状構造は観察されず、細胞周囲では密に並んだコラーゲン線維が細胞から離れるに従い、分散し配列が乱れる傾向を示した。このような異常が細胞増殖に関連するか明らかにするため、PCNA 免疫染色の統計解析を行ったところ、切端側および臼歯側ともに、野生型マウスとペリオスチン欠損マウスにおいて PCNA 陽性細胞の割合に有為差は認められなかった。

コラーゲン分解に関与する MMP-1(McolA, McolB)は、野生型マウスではコラーゲン線維の所見と同様に歯根膜に均一な陽性反応を認めたが、ペリオスチン欠損マウスでは歯根膜線維芽細胞の周囲に斑点状の陽性反応を認めた。F4/80 陽性マクロファージは、野生型マウスではセメント質側と歯槽骨側の境界部に局在する傾向を示したが、ペリオスチン欠損マウスでは、そのような規則性は認めなかった。

【考察】

ペリオスチン欠損マウスの切歯はほとんど萌出しないか、萌出が極めて遅延していることが報告されている。従って、ペリオスチン欠損マウスの歯根膜における基質線維の異常は、切歯の萌出に大きな影響を与えられと考えられる。ファイブロネクチンはコラーゲンと結合することが知られており、一方、ペリオスチンは EMI ドメインを介してコラーゲンおよびファイブロネクチンと結合することが知られている。しかし、ペリオスチンが欠損しても、歯根膜におけるコラーゲンとファイブロネクチンの局在に変化はなかった。これは、ファイブロネクチンの局在はペリオスチンの EMI ドメインのみに依存しないか、もしくは、ファイブロネクチンとコラーゲンの結合が比較的強いと推測される。また、ペリオスチン欠損マウスの歯根膜においてテネイシンCがほとんど局在しなかったことは、歯根膜のようなメカニカルストレス環境下において、テネ

イシン C はペリオスチンを介して他のマトリックス蛋白と結合し細胞外マトリックス複合体を形成すると推測された。透過型電子顕微鏡観察では、ペリオスチン欠損マウスのコラーゲン線維は束や層状構造を作らないこと、また、コラーゲン線維が細胞から離れると分散し配列が乱れることが示された。従って、コラーゲン線維を束ねる構造が形成されない可能性が強く、1つの可能性として、テネイシンCがペリオスチンを介してI型コラーゲンおよびファイブロネクチンとの複合体形成ができないことがコラーゲン線維の分散を誘導すると推察している。I型コラーゲンとファイブロネクチンは、歯根膜線維芽細胞周囲に斑点状に陽性反応を示したが、これは電顕観察で認められた細胞周囲に密集したコラーゲン線維やそれから離れた部位での分散したコラーゲン線維と矛盾しない。ファイブロネクチンは、細胞表面のインテグリンと結合し、細胞接着や遊走、基質、特にコラーゲン線維に対する細胞の方向性に寄与することが報告されており、それはまた、テネイシンCによって調節されることが示されている。従って、I型コラーゲン・ファイブロネクチン・テネイシンC・ペリオスチン複合体は、歯根膜細胞の極性にも関与していると思われる。以上から、ペリオスチンはI型コラーゲン・ファイブロネクチン・テネイシンC等の細胞外マトリックス蛋白の複合体形成や局在性に重要な役割を果たしていると推測され、ペリオスチン欠損により、不規則な歯根膜線維や細胞配列が生じると考えられた。ペリオスチンは正常な歯根膜の改変、すなわち、歯の萌出に関与すると推察される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎
副 査 教 授 網 塚 憲 生
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Altered distribution of extracellular matrix proteins in the periodontal ligament of periostin-deficient mice

(ペリオスチン欠損マウス歯根膜における細胞外マトリックスタンパクの局在の変化)

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者に対して本論文の概要の説明を求めたところ以下の内容について論述した。

本研究では、ペリオスチン欠損マウスの切歯歯根膜を組織学的に検索し、ペリオスチンが欠損することで、歯根膜の I 型コラーゲン、ファイブロネクチン、テネイシン C のような細胞外マトリックスタンパクにどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的とした。

切歯歯根膜の検索に、生後 20 週齢の野生型マウスとペリオスチン欠損マウスを用いた。アルデヒド固定し、下顎骨を摘出後、通法にてパラフィン包埋、エポキシ樹脂包埋を行い、切歯縦断切片を作製した。観察部位を、歯根膜を切縁から 4mm の領域(切端側)と、第一臼歯遠心根直下の領域(臼歯側)の 2 カ所とし、I 型コラーゲン、ファイブロネクチン、テネイシン C、MMP-1、PCNA、F4/80 の免疫染色を行い観察した。また、縦断超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡観察を行った。PCNA 免疫染色に関して、野生型マウス (n=6)、ペリオスチン欠損マウス (n=6) の上記観察領域 2 カ所、長さ 300 μ m の歯根膜における PCNA 陽性細胞数を計測し、比較のため、統計処理を行った。

その結果、野生型マウス切歯歯根膜において、セメント質側では切歯長軸方向に平行に走る線維が、また、歯槽骨側では主に歯槽骨に対して、垂直もしくは斜めに走る線維が観察された。一方、ペリオスチン欠損マウス切歯歯根膜では、幅の肥厚化、不規則な走行を示す歯根膜線維、歯槽骨側とセメント質側の境界の不明瞭化が認められた。

免疫染色の結果、野生型マウスでは、切端側、臼歯側ともに、I 型コラーゲン、テネイシン C、ファイブロネクチンの均一な局在を示したのに対して、ペリオスチン欠損マウスでは、切端側、臼歯側ともに、I 型コラーゲンは歯根膜細胞周囲の分散した線維に一致して不均一に、ファイブロネクチンは歯根膜細胞周囲に細かな斑紋状に陽性反応を認めた。テネイシン C はほとんど

の領域では認められず、歯槽骨側に僅かな陽性反応を示すのみであった。また MMP-1 は、野生型マウスでは、歯根膜に均一に、ペリオスチン欠損マウスでは、主に歯根膜細胞周囲の基質線維に一致して不均一に陽性反応を認めた。F4/80 陽性マクロファージは、野生型マウスにおいて、歯根膜の中間部に局在する傾向を認めたが、ペリオスチン欠損マウスでは、そのような規則性は認められなかった。PCNA 免疫染色の統計解析の結果、切端側、臼歯側ともに、野生型マウスとペリオスチン欠損マウスの PCNA 陽性細胞率に有意差は認められなかった。透過型電子顕微鏡観察の結果、コラーゲン線維の横断像の直径の大きさの違いは認められなかったものの、ペリオスチン欠損マウスでは、野生型マウスで観察される束状のコラーゲン線維や、層状構造はほとんど観察されなかった。

以上から、ペリオスチン欠損マウスで認められた、歯根膜線維の走行の乱れや細胞極性の喪失は、細胞増殖に起因せず、ファイブロネクチンとテネイシン C の異常な局在を反映していると考えられる。それは、ファイブロネクチンは、細胞表面のインテグリンと結合し、細胞接着や遊走、基質、特にコラーゲン線維に対する細胞の方向性に寄与するからである。それゆえに、ペリオスチン欠損マウスで認められる I 型コラーゲン、ファイブロネクチンとテネイシン C の局在の変化は、ペリオスチン欠損マウスでの歯根膜細胞の極性の喪失に関連することが推測される。

したがって、ペリオスチンは細胞外マトリックス蛋白の結合や局在性に重要な役割を果たしていると考えられ、ペリオスチン欠損により不規則な歯根膜線維や細胞配列が生じると考えられた。ペリオスチンは正常な歯根膜の改変、すなわち、歯の萌出に関与すると推察される。

引き続き論文内容及び関連事項について、以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

- (1) マウスの年齢等、研究方法について
- (2) 歯根膜における機械的刺激の分布について
- (3) 歯の萌出に対するペリオスチンの役割について
- (4) 今後の研究の展望について

本研究は、歯根膜におけるペリオスチンの役割を明らかにするために、ペリオスチン欠損マウスにおける歯根膜の性状を詳細に観察したものである。その結果、ペリオスチンは細胞外マトリックス蛋白の結合や局在性に重要な役割を果たしており、正常な歯根膜の改変に強く関与している事を明らかにした。この結果は、歯科医学全体の発展に貢献する重要な基礎的情報を提供しており、高く評価される。加えて、質疑応答から、申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。

以上から、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認めた。