

【203】

氏名	中野 敬介
授与した学位 専攻分野の名称	博士 歯学
学位授与番号	博甲第 1870号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	マウス歯胚基底膜におけるIV型コラーゲン α 鎖の消長に 関する免疫組織学的研究
論文審査委員	教授 山本敏男 教授 杉本朋貞 教授 永井教之

学位論文内容の要旨

【研究目的】

歯の形態形成と細胞分化は連続的な上皮-間葉の相互作用によって制御されており、基底膜は、歯原性上皮とそれに隣接する間葉との間に介在する細胞外マトリックスとして、それらの相互作用に関与していることが知られている。

基底膜の主要構成成分であるIV型コラーゲンは、その特徴として、他の細胞外マトリックスと比較してBMPとの結合能が非常に高いことが知られている。また、BMPはIV型コラーゲン以外の基底膜主要成分であるラミニンやヘパラン硫酸等とは殆ど親和性が無い。本研究では、基底膜の主要な構成成分であり、BMP等の成長因子と強い親和性を持つIV型コラーゲンに注目した。

IV型コラーゲンは3本の α 鎖で構成されているヘテロトリマーで、現在までに $\alpha 1$ から $\alpha 6$ までの6種類の α 鎖が報告されている。IV型コラーゲンの α 鎖の構成は、 $\alpha 1$, $\alpha 1$, $\alpha 2$ の組合せ、 $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ の組合せ、さらにもう1つの組合せとして、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖ともう一本として $\alpha 3$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖以外の α 鎖が組合わさっている分子が推定されている。しかも α 鎖の構成には臓器特異性を有することが知られているが、歯胚形成過程の基底膜におけるこれら α 鎖の局在の詳細は不明である。そこで本研究では、IV型コラーゲン $\alpha 1$ から $\alpha 6$ までの6種類の α 鎖に対するモノクローナル抗体を用い、歯胚の各発育段階における α 鎖の消長を観察し、歯胚の形態形成と機能分化との関連を検索した。

【材料および方法】

実験動物にはICR系マウスを用い、下顎第一臼歯歯胚に対し検索を行った。上皮肥厚期の検索には胎生11日の歯胚、蕾状期の検索には胎生13日の歯胚、帽状期の検索には15日の歯胚、鐘状期の検索には生後1日の歯胚を用いた。

α 鎖(1~6)に対するモノクローナル抗体はラットリンパ節法により作製された(重井医学研究所供与)。 α 鎖の検索は間接蛍光抗体法で行った。厚さ4 μ mの下顎第一臼歯歯胚の未固定凍結切片を作製し風乾後、10分間アセトン固定を施した。さらに20分間の酸性尿素処理で反応抗原を露出させ、PBSで洗浄後、PBSで10倍に希釈したマウス血清で20分間ブロッキングを行った。一次抗体としてTypeIV collagenの $\alpha 1$ ~ $\alpha 6$ 鎖NC1ドメイン特異的モノクローナル抗体を室温で60分反応させ再びPBSで洗浄後、二次抗体としてCy3標識マウ

ス抗ラットIgG抗体 (Jackson)をPBSで300倍に希釈し室温で組織と50分反応させた。反応後、PBSで洗浄し、蛍光封入剤 (Perma Fluor, 日本ターナー) で封入を行い蛍光顕微鏡で観察を行った。

【結果】

上皮肥厚期歯胚の基底膜では、IV型コラーゲン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 鎖の局在が認められた。 $\alpha 3$ 鎖の局在は認められなかった。蕾状期歯胚の基底膜にはIV型コラーゲン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ の局在が認められた。帽状期歯胚の基底膜にはIV型コラーゲン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ 鎖の局在が認められた。 $\alpha 3$, $\alpha 5$ 鎖は消失した。鐘状期歯胚では、歯胚の全周囲基底膜にIV型コラーゲン $\alpha 1$, $\alpha 2$ 鎖の局在が認められ、内エナメル上皮の基底膜に $\alpha 4$ 鎖が限局して認められた。 $\alpha 3$, $\alpha 5$ 鎖の局在は認められなかった。エナメル基質形成開始期の内エナメル上皮では、全てのIV型コラーゲンの各 α 鎖は消失した。 $\alpha 6$ 鎖の局在は歯胚の全てのステージにおいて観察されなかった。

【まとめと考察】

今回の検索の結果、鐘状期の内エナメル上皮の基底膜にはIV型コラーゲン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ 鎖のみが存在することが明らかとなった。鐘状期の歯胚基底膜には既知のIV型コラーゲンの α 鎖の組合せ以外に、IV型コラーゲン $\alpha 4$ 鎖を含む未知の組合せがあり、歯胚特有である可能性が考えられた。またIV型コラーゲン α 鎖の局在には時期および部位特異性が認められた。すなわち歯胚発生の初期 (上皮肥厚期~帽状期初期) の段階の基底膜ではIV型コラーゲン $\alpha 1$, $\alpha 2$ 鎖に加え、IV型コラーゲン $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 鎖が存在する。IV型コラーゲン $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 鎖は、糸球体基底膜、肺胞基底膜に限局して分布していることが知られており、それぞれが血液・尿関門、血液・空気関門を構成している。いずれも基底膜を間に挟み双方向の物質輸送が行われている場所である。歯胚でも、この時期は歯原性上皮細胞の増殖、間葉系細胞の凝集のような上皮-間葉の相互作用が生じていると考えられる。これらの事から類推すると初期歯胚の基底膜におけるIV型コラーゲン $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 鎖は、歯原性上皮および歯乳頭で発現している物質の輸送や、BMP等の成長因子と結合し、上皮と間葉双方向にシグナルの伝達を行い、歯原性上皮細胞の増殖、間葉系細胞の凝集など歯胚の形態形成に関与していると考えられた。一方、IV型コラーゲン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ 鎖の局在がみられる歯胚発生の後期 (帽状期後期~鐘状期) では、象牙芽細胞の機能分化が生じる時期であり、鐘状期の内エナメル上皮には成長因子であるBMP4, 5の発現が認められることが報告されている。従って鐘状期の内エナメル上皮の基底膜において、IV型コラーゲン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ 鎖で構成されるIV型コラーゲンは、これらと親和性があるBMP4, 5のような部位特異的に発現した内エナメル上皮由来の成長因子と結合し、成長因子の拡散を防ぎ、限局してその活性を発現させること等で象牙芽細胞の分化を促している可能性があると考えられた。

論文審査結果の要旨

本研究はマウス歯胚の各発生段階における基底膜IV型コラーゲン $\alpha 1 \sim \alpha 6$ 鎖の局在と消長を観察し、歯胚の形態形成、細胞分化との関連を考察したものである。その結果、

1. 歯胚の発生段階で、基底膜IV型コラーゲンの α 鎖の組成に違いがあり、 $\alpha 1$ 鎖から $\alpha 5$ 鎖は、歯胚各上皮基底膜で時期および部位特異的な推移のあることが示された。血管基底膜、胎生期口腔粘膜上皮基底膜は $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖のみの組成であることが示された。
2. 上皮肥厚期、蕾状期、帽状期初期までの歯胚基底膜ではIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖以外に $\alpha 3$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖が認められた。初期歯胚の形態形成に関与している α 鎖の組み合わせには、 $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 以外に $\alpha 3(\text{IV})\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV})$ が存在すると考えられた。
3. 帽状期後期から鐘状期にかけて、内エナメル上皮基底膜にはIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖が、一方、外エナメル上皮の基底膜には $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖のみが認められた。前者には $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ の組み合わせと、これまで報告の無い $\alpha 4$ 鎖を含む組み合わせの存在が示唆された。

以上の内容は歯胚発生過程において、基底膜IV型コラーゲン α 鎖の推移と形態形成、機能分化との関連の一端を明らかにするものであり、歯胚発生とその形態形成の仕組みを明らかにしていく上で重要な基礎的研究であると評価できる。よって、本申請論文は学位論文の価値があるものと認める。