

氏名 平田 あずみ

授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博士 乙 第 4022 号

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 25 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)

学位論文題名 セメント質形成過程における上皮鞘基底膜プロテオグリカンの動態に関する研究

論文審査委員 教授 永井 教之 教授 杉本 朋貞 教授 山本 敏男

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯の発生には上皮組織と間葉組織の相互作用が必須であり、セメント質形成は、歯小囊の細胞が Hertwig 上皮鞘の網目を通り抜け歯根象牙質の表層に配列しセメント芽細胞へ分化することによって開始する。分化したセメント芽細胞はセメント質基質の合成と分泌をするようになる。しかしながら、セメント芽細胞分化に重要と考えられる上皮鞘基底膜断裂の機構については不明である。一般に、基底膜はIV型コラーゲンやラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンなどで構築されているが、基底膜の分解はメラノーマヘパラン硫酸特異的エンドβ-D-グルクロニダーゼ（ヘパラナーゼ）が特異酵素として関与していることが報告されている。本研究は Hertwig 上皮鞘基底膜の断裂と歯小囊細胞のセメント芽細胞への分化機構を明らかにすることを目的として、パールカンならびにヘパラナーゼに着目しセメント質形成過程におけるこれらの局在性について微細構造学ならびに免疫組織化学的に検討した。

【材料と方法】

1, 2, 3 週齢 ICR マウス, 計 12 匹を灌流固定したのち下顎骨を採取し, 5%EDTA (4℃) で脱灰した。観察は下顎臼歯とした。

1. 形態学的観察

H-E 染色切片を顕微鏡で観察するとともに, Epon 切片を作製し電顕で観察した。

2. 歯胚基底膜の免疫組織化学的観察

パラフィン切片を作製しラミニンとパールカンの二重染色をしたのち蛍光顕微鏡で観察した。

3. 抗ヘパラナーゼ抗体の作製

マウスヘパラナーゼの DDVVDLEFYTKRPLRSVS (28-45aa) に対する合成ペプチドにヘモシアニンを結合させウサギに免疫した。得られた抗血清を同ペプチドカラムで精製した。

4. タンパク抽出およびウェスタンブロッティング

3 週齢マウス 5 匹より抜歯した下顎臼歯から RIPA バッファーでタンパクを抽出し, アセトン濃縮後, SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングを行った。

5. ヘパラナーゼ局在の免疫組織化学的観察

作製した抗ヘパラナーゼ抗体を用いて免疫染色し, 顕微鏡で観察した。

【結果】

1. 生化学的所見

抗ヘパラーゼ抗体と反応する 42kDa のバンドが認められた。

2. 組織学的所見

歯冠の形成に引き続き内外のエナメル上皮は Hertwig 上皮鞘として認められた。歯根形成が進むと歯根象牙質が根尖側へと伸長し、上皮鞘の断裂像が観察された。歯根表面には無細胞性セメント質、周囲には断裂した上皮鞘細胞が認められ、さらに歯根形成が進むと根尖側歯根表層には有細胞性セメント質が形成されるようになり、歯頸側歯根表層には Malassez の上皮遺残が存在した。Hertwig 上皮鞘の断裂部を電顕で観察すると、歯小囊細胞が上皮鞘細胞の間隙より歯根表層へと突起を伸ばし、そこでは基底膜が消失していた。

3. 基底膜の免疫組織化学的所見

基底膜は歯根形成全てのステージにおいて上皮鞘を取り囲み、また、歯根表層に断続的に観察され、さらに Malassez の上皮遺残周囲にも存在した。上皮鞘周囲基底膜に観察されたパールカンは、歯根形成の進行に伴い外エナメル上皮側が陰性となり、その後、内エナメル上皮側も陰性となった。歯根表層にはパールカンの反応は認められず、また Malassez の上皮遺残周囲基底膜は陽性のものと陰性のものが存在した。

4. ヘパラーゼの免疫組織化学的所見

歯根形成全ステージにわたり、Hertwig 上皮鞘にヘパラーゼの局在が認められ、反応は内・外エナメル上皮細胞の細胞質に観察された。断裂した上皮鞘細胞にも反応が認められたが、歯根の完成が近くなると Hertwig 上皮鞘のみが陽性を呈し Malassez の上皮遺残は陰性であった。

【考察】

これまでに歯根形成とパールカンの動態について調べた報告はなく、本研究において歯根形成期の歯胚基底膜におけるパールカンの局在がはじめて明らかとなった。すなわち、Hertwig 上皮鞘はその周囲を基底膜で囲まれ、その基底膜にはパールカンが存在するが、歯根形成の進行に伴い消失することが示された。さらに、本研究により歯根形成期においてパールカンの分解酵素ヘパラーゼが活性型として上皮鞘細胞に局在していることが示され、パールカンの消長とヘパラーゼの局在には相関関係があることが示唆された。パールカンはヘパラン硫酸鎖に結合している成長因子のシグナルを調節することで、細胞の分化・増殖に特異的な働きをすること、また、ヘパラーゼはヘパラン硫酸鎖を特異的に切断し抱合している増殖因子を活性化することが知られている。これらの報告と本研究の結果より、歯根の形成過程において Hertwig 上皮鞘細胞が分泌したヘパラーゼは基底膜の分解に関与し、基底膜に存在するパールカンに抱合されているさまざまな成長因子を遊離・活性化することにより歯小囊細胞のセメント芽細胞への分化・増殖を惹起する可能性が推測された。

論文審査結果の要旨

本研究はセメント質形成過程における Hertwig 上皮鞘基底膜の断裂と歯小囊細胞のセメント芽細胞への分化機構を明らかにすることを目的として、パールカンならびにヘパラナーゼに着目しこれらの局在性について微細構造学的、免疫組織化学的に検討したものである。従来、歯根形成とパールカンの動態について調べた報告はなく、本研究において歯根形成期の歯胚基底膜におけるパールカンの局在がはじめて明らかとなった。すなわち、Hertwig 上皮鞘はその周囲を基底膜で囲まれ、一般の基底膜と同様にパールカンが存在することが示された。また、歯根形成の進行に伴いパールカンは消失することが明らかとなり、消失は外エナメル上皮側から生じ、内エナメル側へと進行することが示された。さらに本研究により歯根形成期においてパールカンの分解酵素ヘパラナーゼが活性型として上皮鞘細胞に局在していることが明らかとなり、パールカンの消長とヘパラナーゼの局在には相関関係があることが示唆された。また、一般に、ヘパラナーゼは細胞外基質に広く存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンを基質として分解することで細胞の浸潤を促進することが報告されており、本研究においてヘパラナーゼが Hertwig 上皮鞘に強い局在性を示したことは Hertwig 上皮鞘が歯根形成を誘導する際に周囲組織を分解し歯根の伸張を容易にしている可能性が示唆された。

パールカンはヘパラン硫酸鎖に結合している成長因子のシグナルを調節することで細胞の分化・増殖に特異的な働きをすること、また、ヘパラナーゼはヘパラン硫酸鎖を特異的に切断し抱合している成長因子を活性化することが知られている。これらの報告と本研究の結果より、歯根の形成過程において Hertwig 上皮鞘細胞が分泌したヘパラナーゼは基底膜の分解に関与し、基底膜に存在するパールカンに抱合されている成長因子を遊離・活性化することにより歯小囊細胞のセメント芽細胞への分化・増殖を惹起する可能性が推測された。これらの結果は歯根形成、特にセメント質形成における細胞分化にあらたな視点を与えるものである。よって、本申請論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと認めた。