

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ① 課 ・ 論	第 号	氏 名	濱田 康英
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	濱 田 文 彦	② 濱
	副査氏名	植 邊 誠	③ 植
	副査氏名	伊波 英克	④ 伊 印
論文題目 The pro-$\alpha 2$ (XI) collagen gene is expressed in odontoblasts 論文掲載誌名 Biochemical and Biophysical Research Communication 392, 166-170 (2010) 論文要旨 【緒言】象牙芽細胞は歯髄内に存在し、骨芽細胞と類似の細胞外マトリックスを産生する。コラーゲンは細胞外マトリックスの主要な分子であり、コラーゲン線維形成に関与するコラーゲン分子には major type の I、II、III 型と minor type、V、XI 型がある。V 型は I 型とともに骨、皮膚等で、XI 型は II 型とともに軟骨で発現し、I 又は II 型の線維の直径を調整していると考えられている。象牙芽細胞は主に I 型コラーゲンを発現していることが知られていたが、本研究において V 型に加え XI 型 $\alpha 2$ 鎖遺伝子も発現することを明らかにした。 【結果】RT-PCR の結果、歯牙組織においては I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の他、V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、$\alpha 2$ 鎖 XI コラーゲン $\alpha 1$、$\alpha 2$ 鎖遺伝子の発現が認められた。In situ hybridization 法によっても、RT-PCR と同様な発現が認められた。特に、XI 型 $\alpha 2$ 鎖遺伝子は象牙芽細胞特異的遺伝子である DSPP (dentin sialophosphoprotein) に一致して発現し、その発現は、マウス胎生期においては象牙芽細胞が形成される 16.5 日から認められた。そこで、抗 XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖抗体を作製し、象牙芽細胞において XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖蛋白質の発現を確認した。一方、歯牙組織を歯根部と歯冠部に分けて V 型、XI 型 α 鎖遺伝子の発現を Real-time PCR 法にて定量すると、XI 型 $\alpha 2$ 鎖、V 型 1 鎖及び 2 鎖遺伝子は歯冠部に発現が多く、逆に XI 型 $\alpha 1$ 鎖遺伝子は歯根部に発現が多く歯冠部では減少していた。さらに、歯牙組織より細胞を採取し、テロメアーゼを用いて不死化象牙芽細胞を作製した。株化した細胞は RT-PCR 法にて DSPP の発現を認め、同様に XI 型 $\alpha 2$ 鎖遺伝子の発現も認めた。この不死化細胞をヌードマウスに移植した組織では、DSP (DSPP 遺伝子由来タンパク) やアルカリフォスファターゼの発現と共に、XI 型 $\alpha 2$ 鎖の発現を認めた。 【考察および結語】本研究において、XI 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖が象牙芽細胞に発現していることを明らかにした。XI 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖の発現は認められなかった。従って、象牙芽細胞においては XI 型 $\alpha 2$ 鎖のホモトリマー、またはこの鎖を含む他の V/XI 型 α 鎖とのヘテロタイプの新しいサブタイプ分子の存在が示唆された。 本研究は、軟骨に特異的に発現するとされていた XI 型 $\alpha 2$ 鎖遺伝子が、象牙芽細胞においても発現することを明らかにした、意義のある研究である。よって審査委員は、本論文を学位論文に値するものと判定した。			

学 位 論 文 要 旨

氏名 濱田 康英

論 文 題 目

The pro- $\alpha 2$ (XI) collagen gene is expressed in odontoblasts(XI 型プロコラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子は象牙芽細胞に発現する)

要 旨

緒言：象牙芽細胞は歯の象牙質を形成する間葉系細胞の一つである。歯髄内に存在し、骨芽細胞と類似の細胞外マトリックスを産生する。コラーゲンは細胞外マトリックスの主要な分子で臓器形成に関与する。コラーゲン線維形成に関与するコラーゲン分子には I、II、III、V、XI 型がある。その中で V、XI 型コラーゲンは量的には少ないが、線維の中心に存在し線維の直径を調整している。象牙芽細胞は主に I 型コラーゲンを発現しているが、本研究において V、XI 型コラーゲンを構成する α 鎖遺伝子の発現を調べたところ、軟骨に特異的に発現するとされる XI 型 $\alpha 2$ 鎖遺伝子の発現を認めた。

方法：①遺伝子の発現を調べるために RT-PCR を行った。②歯牙組織における遺伝子発現の分布を調べるために in situ hybridization を行った。③XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖タンパクの分布を調べるため特異的なポリクローナル抗体を作製し、免疫組織化学染色を行った。④歯冠部及び歯根部より組織を採取し、各 V、XI 型コラーゲン α 鎖遺伝子産物を Real-time PCR 法で定量した。⑤歯牙組織より象牙芽細胞を採取し、テロメラーゼ遺伝子を用いて不死化象牙芽細胞株を樹立した。⑥不死化象牙芽細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍細胞における XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の発現を調べた。

結果：RT-PCR の結果、歯牙組織においては I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の他、V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、

XI コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 鎖遺伝子の発現がみられた。しかし、軟骨組織に特異的な II 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 (その修飾型は XI 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖) や V 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖遺伝子の発現は見られなかった。In situ hybridization 法で V 型、XI 型 α 鎖の遺伝子発現をみると、RT-PCR と同様な発現がみられた。特に、XI 型 $\alpha 2$ 鎖遺伝子は象牙芽細胞特異的遺伝子である DSPP (dentin sialophosphoprotein) に一致して発現し、マウス胎生期においては象牙芽細胞が形成される 16.5 日から認められた。そこで、ウサギを用いて XI 型 $\alpha 2$ 鎖を特異的に認識するポリクロナール抗体を作製した。これを用いて免疫組織化学染色を行うと、XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖は象牙芽細胞に発現を認めた。一方、歯牙組織を歯根部と歯冠部に分けて V 型、XI 型 α 鎖遺伝子の発現を Real-time PCR 法にて定量した。その結果、XI 型 $\alpha 2$ 鎖、V 型 1 鎖及び 2 鎖遺伝子は歯冠部に発現が多く、逆に XI 型 $\alpha 1$ 鎖遺伝子は歯根部に発現が多く歯冠部では減少していた。最後に象牙芽細胞が実際に XI 型 $\alpha 2$ 鎖を産生しているか調べるために、歯牙組織より細胞を採取し、テロメラーゼを用いてで不死化象牙芽細胞を作製した。株化した細胞は RT-PCR 法にて DSPP の発現を認め、同様に XI 型 $\alpha 2$ 鎖遺伝子の発現も認めた。この不死化細胞をヌードマウスに移植し、増殖した腫瘍組織を用いて免疫組織化学染色を行うと、DSP (DSPP 遺伝子由来タンパク) やアルカリフォスファターゼの発現と共に、XI 型 $\alpha 2$ 鎖の発現を認めた。

考察及び結語：この研究で XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖が象牙芽細胞に発現していることを認めた。XI 型コラーゲンは $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 鎖よりなり軟骨に特異的に発現している。しかし、 $\alpha 1$ 鎖は非軟骨組織にも発現している。XI 型コラーゲンは軟骨内の II 型コラーゲンと共に軟骨におけるコラーゲン線維を形成する。一方、I 型コラーゲンは V 型コラーゲンと共に非軟骨組織において、軟骨のコラーゲン線維より太いコラーゲン線維を形成する。また、これまでには XI 型と V 型の α 鎖のミックスによるヘテロタイプの分子として $[\alpha 1(XI)]_2\alpha 2(V)$ の存在も認められている。また、XI 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖を欠損する cho マウスでは、XI 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の代わりに V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖を含む $\alpha 1(V)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$ の分子が軟骨に存在すると思われる。今回の研究で象牙芽細胞において、XI 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖の発現は認められなかったが、 $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖の発現が認められた。従って、象牙芽細胞においては XI 型 $\alpha 2$ 鎖のホモトリマー、またはこの鎖を含む他の V/XI 型 α 鎖とのヘテロタイプの新しいサブタイプ分子の存在が示唆される。