

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463202

研究課題名(和文)新しい象牙質形成不全症モデルを用いたV型コラーゲンの発現機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the collagen type 5 expression mechanism in new DI model mice

研究代表者

伊平 弥生 (IDAIRA, Yayoi)

鶴見大学・歯学部・学内講師

研究者番号：40200018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Zip13は、型コラーゲンの生合成に強く関与していることが示唆される遺伝子である。そのため、Zip13KOマウスの歯根象牙質で生じた質的な異常の多くは、型コラーゲンの異常であると思われるが、型コラーゲンの発現も解明できるのではないかと考えた。しかしながら、ISHや免疫染色などで、型コラーゲンの異常は見られなかった。型コラーゲンの発現部位はWTマウスでは歯槽骨、KOマウスでは歯槽骨と歯根象牙質における質的な異常を示す成長線様の縞模様部であった。よって、歯根象牙質の異常は、型コラーゲンの異常だけでなく、象牙質に特有なDSPPやDSPのような非コラーゲン性タンパク質の異常もあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is reported that the Slc39a/Zip13 is related to biosynthesis of Type I collagen. Although Zip13 KO mice in root dentine observe the qualitative abnormality for type I collagen, it is still obscure to the onset of Type V collagen. In this study we observed to the onset of type V collagen. As results, the reaction to the antibody of type V and III collagen were not observed both in Zip13 WT and KO mice by ISH. However, the antibody of type I was reacted at alveolar bone in Zip13 WT mice, but observed in not only at alveolar bone but also in root abnormal dentine in Zip13 KO mice by immunohistochemical staining. All over results suggests that the non-collagenous protein such as DSPP, and/or DSP are related to the deposition of qualitative abnormal root dentine in Zip13 KO mice.

研究分野：小児歯科学

キーワード：Zip13 Zip13KOマウス 型コラーゲン 鍍銀染色 免疫染色 象牙質形成不全症 歯根象牙質 象牙芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らはヒトとマウスの結合組織の発生に重要であり、歯根形成に関する重要な遺伝子の一つである SLC39A13/Zip13 は亜鉛トランスポーターの一つであり、骨芽細胞、軟骨細胞、歯髄由来細胞および線維芽細胞などのゴルジ体に局在していることを示し、Zip13 の発現時期が2週から4週であることを特定した。

(2) Zip13 をノックアウトしたマウス (Zip13KO マウス) は成長遅延をはじめ、骨格形成異常、コラーゲンの形態異常を伴う皮膚の脆弱化、歯および歯周組織の形態異常など間葉系結合組織の進行性の形態異常を発症することを示した。ヒトでは結合組織疾患と骨形成不全症の2つの特徴を持つ Ehlers-Danlos syndrome の表現型と高い相関性があった。

(3) Zip13KO マウスと WT マウスの第一臼歯を観察した。WT マウスでは Zip13 発現時期に関係なく、均一な象牙質が形成されていたが、Zip13KO マウスでは Zip13 が発現していない2週齢から4週齢に作製された象牙質は歯根の厚みが増さず、その象牙質には HE に染色度の低い成長線様の縞模様が見られた。成長線様の構造はそれ以降はみられなくなり、歯根象牙質の厚みも増した。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者らはヒトとマウスの結合組織の発生に重要であり、歯根形成に関する重要な遺伝子の一つである SLC39A13/Zip13 は亜鉛トランスポーターの一つであり、骨芽細胞、軟骨細胞、歯髄由来細胞および線維芽細胞などのゴルジ体に局在していることを示し、Zip13 の発現時期が2週から4週であることを特定した。

(2) Zip13 をノックアウトしたマウス (Zip13KO マウス) は成長遅延をはじめ、骨格形成異常、コラーゲンの形態異常を伴う皮膚の脆弱化、歯および歯周組織の形態異常など間葉系結合組織の進行性の形態異常を発症することを示した。ヒトでは結合組織疾患と骨形成不全症の2つの特徴を持つ Ehlers-Danlos syndrome の表現型と高い相関性があった。

(3) Zip13KO マウスと WT マウスの第一臼歯を観察した。WT マウスでは Zip13 発現時期に関係なく、均一な象牙質が形成されていたが、Zip13KO マウスでは Zip13 が発現していない2週齢から4週齢に作製された象牙質は歯根の厚みが増さず、その象牙質には HE に染色度の低い成長線様の縞模様が見られた。成長線様の構造はそれ以降はみられなくなり、歯根象牙質の厚みも増した。

3. 研究の方法

(1) 形態学的観察: Zip13KO マウスと WT マウスの歯根形態形成の違いを知るために2週齢、4週齢、6週齢、12週齢のマウスの第一臼歯歯根から試料を作製した。HE染色、鍍銀染色、マッソン・トリクローム染色により形態学観察を行った。TEM と SEM により微細構造分析を行った。

(2) 免疫素歯学的観察: 2週齢、4週齢、6週齢、12週齢の WT マウスならびに Zip13KO マウスにおいて、コラーゲンの免疫染色を行い、第一臼歯周囲におけるコラーゲンの発現を観察した。2週齢と3週齢の各マウスでは COL1、Col1 2、Col5 2 のプローブを用いて In situ ハイブリダイゼーション (ISH) を行い、COL1、Col1 2、Col5 2 遺伝子の mRNA の発現を検証した。6週齢と12週齢の各マウスではコラーゲン (Col3-1) とコラーゲン (Col5) の遺伝子の発現を検証した。

(3) ヒト象牙質形成不全症 (DI) の脱落乳歯の観察: ヒト象牙質形成不全症 (DI) の脱落乳歯と Zip13KO マウスの象牙質の状態を比較することにより類似点がおおければよりモデルマウスとして利用価値が高まると考え、比較検討を行った。DI を伴う骨形成不全症 (OI) 型の患児から集めた脱落乳歯と健全な脱落乳歯から研磨標本ならびに鍍銀染色を行い形態観察を行った。さらに Zip13KO マウスとの違いも観察した。

4. 研究成果

(1) 形態学的観察

HE染色: WT マウスは2週齢から12週齢にかけて均一な象牙質が形成されていた。一方 Zip13KO マウスでは2週齢から4週齢にかけて象牙質の形成は遅く、薄かった。4週齢では数本の層板状の不規則な成長線様構造を認めた。12週齢では4週齢までに形成された不規則な成長線様の構造は観察されるものの歯髄側にこれまでの象牙質とは違う新たな象牙質が形成された。新たに形成された象牙質は WT マウスに見られる象牙質に類似しており成長線様の構造は見られなかった。

鍍銀染色: 2週齢、6週齢と12週齢の Zip13KO マウスと WT マウスについて鍍銀染色した歯根象牙質を観察した。WT マウスでは週齢に関係なく均一な象牙質が観察された。Zip13KO マウスでは4週齢までに形成された象牙質とこれ以降に形成された象牙質に明確な違いが認められた。4週齢以前に形成された象牙質は細く、周期的なコラーゲン線維の沈着を認め、不規則な成長線様の縦の縞模様が入っていた。それ以降に形成された象牙質は均一なコラーゲン線維であり、WT マウスでみられた象牙質に類似していた。

歯髄細胞から分泌されるコラーゲン線維からなるコルプの線維は WT マウスと比べて Zip13K0 マウスで著しく少なかった。

マッソン・トリクローム染色：マッソン・トリクローム染色ではコラーゲン線維は青く染まり、細胞質は赤く染まる。2~3 週齢の WT マウスでは象牙質の周囲は青色であり、コラーゲン線維が多いことを示していた。中心部は青色と赤色が混じっていた。それに対し K0 マウスの歯根は全体的に青色であった。WT マウスで観察された歯髄側にある象牙芽細胞は整列していたが、Zip13K0 マウスの象牙芽細胞は無秩序に配列していた。

透過型電子顕微鏡：WT マウスの象牙質中のコラーゲン線維は切片上で種々の方向に錯走していた。線維の太さはほぼ均一であり、密集していた。Zip13K0 マウスのコラーゲン線維は密集しておらず、線維の太さにばらつきが見られた。

(2) 免疫組織学的観察

免疫染色

コラーゲン：WT マウス、K0 マウスともに 2, 4, 6, 12 週齢で歯槽骨、血管、セメント質、象牙質で発色が観察された。WT マウスの象牙質の発色は微弱であった。4 週齢以降の Zip13K0 マウスでは象牙質の成長線様の縞模様部位でコラーゲンの発現を示す特異的な発色が確認された。それ以外の象牙質における発色は WT マウス同様に微弱であった(図)。

In situ ハイブリダイゼーション

Col1 1、Col1 2 ならびに Col5 2: WT マウス、Zip13K0 マウスとも象牙芽細胞、歯根膜ならびに歯槽骨で発色がみられた。

コラーゲン、：WT マウス、Zip13K0 マウスとも歯根膜で特異的な発色が観察されたが、象牙質での発色は認められなかった。

(3) ヒト骨形成不全症脱落乳歯の形態観察

骨形成不全症 型である本症例では線維芽細胞におけるコラーゲン分析ならびに遺伝子解析から、Collagen 2 鎖の異常と COL1A2 の異常が確認されている。この患者の交換期における脱落乳歯(上顎右上乳側切歯)の形態観察では、色調はオパール様、歯髄はわずかに存在していた。2 分割した切断面をみると、成長線様の層板構造が歯冠・歯根象牙質に様に認められた。層板構造の部分は高石灰化を示していた。健全象牙質と比べて、透明性の高い象牙質であり、象牙細管の減少傾向が認められた。鍍銀染色からも象牙細管の走行はみだれ、連続性が見られなかった。

Zip13K0 マウス第一臼歯と DI (0I 型) 脱落乳前歯の比較

	Zip13K0	DI (0I 型)
COL1A2	異常なし	COL1A2
Zip13	なし	不明
色調	白	オパール色
歯髄の有無	有	無/わずか
象牙細管	長さ：不均一 数：少ない	長さ：不均一 数：少ない
象牙質切断面	一部に成長線あり	全体的に成長線あり

本所見は、マウスでの象牙質形成不全 (DI) 第一臼歯とヒトでの DI を伴う骨形成不全症の脱落乳前歯の症例を比較したものをまとめたものである。多くの相関性があると思われるが、現在とりまとめ中であり、さらに検討を加え、近日中に論文として投稿を予定している。

Zip13K0 マウスは 4 週齢までに形成された象牙質の厚さは著しく薄く、不規則な成長線がある。またコラーゲン線維の密度は低く、線維の太さが不均一であることが認められた。これらの 4 週齢までに認められた歯根象牙質の形成異常はコラーゲンの異常が誘因となっている可能性が高いと思われた。コラーゲンの発現部位を示す免疫染色から、WT マウス Zip13K0 マウスともに歯槽骨に発現し、象牙質ではごく弱い発現が認められた(図)。Zip13K0 マウスでは歯根象牙質の不規則な成長線を示す部位では強く発現していた。象牙質内では 型、型コラーゲンの異常は見られなかった。型コラーゲン遺伝子 (COL1A1, COL1A2) と型コラーゲン遺伝子 (COL5A2) のそれぞれの mRNA の発現に違いはみられなかった。

結果、Zip13 の機能喪失によって 型、型コラーゲンの生成に異常は生じなかった。Zip13 の機能喪失により、線維芽細胞、象牙芽細胞を介する型コラーゲンの産生、分泌、修飾に支障が生じていた。そのためコラーゲンの恒常性を維持することが難しくなっていたため象牙質に質的異常が生じたものと考えられる。また、この時に生じた歯根象牙質の異常は象牙芽細胞や線維芽細胞から産出される歯根象牙質に特有な非コラーゲン性タンパク質にも異常をもたらし、石灰化の異常を来したため、象牙質に見られた不規則な成長線となっているのかもしれない。

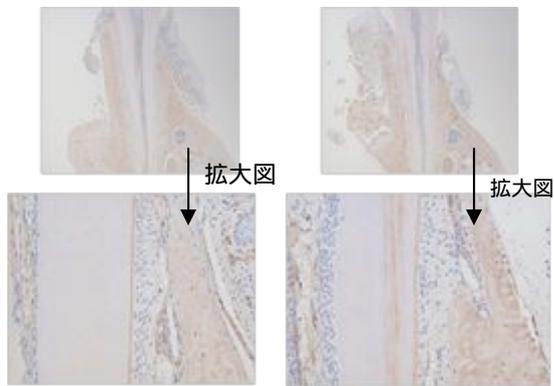


図 コラーゲン1 免疫染色 12w 齢
WT マウス KO マウス

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Yayoi Idaira, Takaaki Munemasa, Toshiyuki Fukada, Shinji Shimoda, Yoshinobu Asada, : Role of ZincTransporter ZIP in degenerative changes in periodontal ligament and alveolar bone, Journal of hard tissue biology, 査読あり、25,2016,49-56.

深田俊幸、伊平弥生、下田信治、朝田芳信、：象牙質形成と歯周組織の恒常性に関わる亜鉛シグナリング、査読なし、25,2015,2-9.

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊平 弥生 (IDAIRA, Yayoi)
鶴見大学・歯学部・学内講師
研究者番号：40200018

(2)研究分担者

朝田 芳信 (ASADA, Yoshinobu)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：20184145

下田 信治 (SHIMODA, Shinji)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：30139620