

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏 名 (本籍)	宗 正 隆 明 (神奈川県)
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 424 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学 位 論 文 題 目	Histological Analysis of Dentinogenesis Imperfecta in Slc39a13/Zip13 Knockout Mice (Slc39a13 /Zip13 ノックアウトマウスにみられる象牙質形成異常に対する 組織形態学的研究) Journal of Hard Tissue Biology impress
論 文 審 査 委 員	主査 教授 斎藤一郎 副査 教授 下田信治 副査 教授 朝田芳信

内 容 の 要 旨

【緒言】

ヒト象牙質形成不全症は、臨床所見から 2 つのタイプに大別され、骨形成不全症に随伴するタイプと象牙質だけに形成異常が出現するタイプである。発症頻度からみると、骨形成不全症に随伴する象牙質形成不全症 I 型が最も多く、組織構造に関しては、象牙質の層状石灰化と急激な構造変化を示す境界線の存在が挙げられ、主な原因として I 型コラーゲン線維の質的・量的異常によることが報告されている。

近年、生体における亜鉛トランスポーターと呼ばれる一群の遺伝子の役割を解明する目的で、亜鉛トランスポーターのひとつである、Slc39a13/Zip13 遺伝子のノックアウトマウス(以下、Zip13-KO マウス)が作製された。そこで、Zip13 遺伝子は、骨、歯、血管などの組織の形成に作用する BMP(Bone Morphogenetic Protein)や、さまざまな細胞の増殖や分化、胚発生、結合組織の形成、骨形成などに作用する TGF- β (Transforming growth factor- β)の情報伝達制御に関わることが報告され、マウスにおいて ZIP13 遺伝子がコラーゲン等の結合組織の発生と BMP/TGF- β の情報伝達に極めて重要であり、ヒトにおいても同様の役割があることが示唆されている。

Zip13-KO マウスは、ヒト象牙質不全症 I 型の臨床所見である歯根の短縮や歯髓腔の狭窄、エナメル質の剥離を伴う顕著な咬耗が認められないなど、ヒト象牙質形成不全症 I 型とは臨床所見において一致していない点もあり、Zip13 遺伝子が象牙質の基質線維に及ぼす影響については不明な点も多い。しかしながら、Zip13-KO マウスにみられる象牙質形成障害が I 型コラーゲンの質的・量的な異常によるものなのかを知ることは、臨床的ヒト象牙質形成不全症の病態を知る上で大変重要と考えられた。

そこで、本研究では、Zip13-KO マウスがヒト象牙質形成不全症の発症機序を解明するための

疾患モデルとなり得るのかを目的に、象牙質の基質コラーゲン線維の形態形成に注目し、組織形態学的観察を行った。

【材料および方法】

実験には生後 2、4、6、12 週齢のマウス 48 匹(Zipl3-KO マウス、WT マウスそれぞれ 24 匹)の下顎第一臼歯を用い、光学顕微鏡的観察として、H.E.染色法および鍍銀染色法を、超微細構造的観察として、走査電子顕微鏡法および透過型電子顕微鏡法、I 型コラーゲンの抗体を用いた免疫染色法を実施した。

【結 果】

1 光学顕微鏡所見

1) H.E.染色所見

(1) 象牙質の形成量

H.E.染色より象牙質の厚さを測定したところ、WT マウスの形成量は $2.5\mu\text{m}/1$ 日であった。一方、Zipl3-KO マウスの形成量は、 $1.7\mu\text{m}/1$ 日であった。

(2) 象牙質基質の状態

WT マウス 4 週齢以降では、象牙質の形成と共に歯髄側で象牙細管が明瞭で、以後、加齢に伴って持続的に形成が継続するが、Zipl3-KO マウス 4 週齢では、層状構造を呈する象牙質が観察される。さらに 6、12 週齢では、再び歯髄側に均質な象牙質が観察される。また、象牙芽細胞層は細胞形態と配列が不規則であった。

2) 鍍銀染色による所見

WT マウスでは、規則正しい基質線維が観察された。一方 Zipl3-KO マウスは、銀染色で基質線維の配向方向の乱れが顕著であった。また、淡染する線維の層と濃染する線維の層の違いが明瞭であった。

2 電子顕微鏡所見

1) BEI による所見

WT マウスでは、表層に細い象牙細管が観察され、次第に歯髄側に向かって象牙細管の太さが増す像が観察された。一方、Zipl3-KO マウスでは、H.E.染色で色素に淡染し層状を呈する領域は、反射電子の高信号を示した。

2) TEM による所見

WT マウスでは周期的な 64nm の I 型コラーゲン線維と、ほぼ均質な太さのコラーゲン線維が一定方向に配列する状態が観察された。一方、Zipl3-KO マウスでは、疎らに配列する線維と多数の粒状構造が交互に層をなして観察された。

3 免疫組織化学的所見

WT マウスでは、象牙質の全層にわたって反応が弱かった。一方、Zipl3-KO マウスでは、I 型抗体に強く反応する領域が観察された。しかし、その歯髄側では再び免疫反応は弱い領域が観察された。

【考察】

これまでのヒトの象牙質形成不全症に関する象牙質の形態学的観察において、急激な象牙質基質の構造変化と層状構造を呈する象牙質の石灰化不全が共通の所見として報告されている。本研究に用いた Zipl3-KO マウスは、ヒトの象牙質形成不全症の形態学的報告とよく一致した無秩序な細管

構造や、層状構造を呈する象牙質の石灰化不全についても一致する不定形の紋様が観察された。

層状構造の発現時期に関しては、本研究の測定結果では、2～3 週目であり、深田らの結果と概ね一致している。また、歯髄側に形成される異常な境界の出現に関する詳細なシグナルカスケードについては不明であるが、少なくとも象牙芽細胞の細胞内シグナル伝達に Zip13 の影響による異常が生じていることが推察される。古くからエストロゲンやメラトニンは、細胞の概日リズムと関与することが知られており、層状構造や境界明瞭な象牙質を成長線の一つとして捕らえるならば、Zip13 遺伝子の欠損したマウスでは、象牙芽細胞に概日リズムの乱れを生じ、結果的に層板状の構造や境界明瞭な象牙質の成長線様の構造物として観察されたと考えられる。

以上の層状構造領域を透過型電子顕微鏡像で観察した結果、層状構造を呈する領域では大小さまざまなコラーゲン線維が比較的密に配列する層と、コラーゲン線維が疎で、かつその中に散在する大小の粒状構造が細い線維によって連なる 2 種類の層の繰り返しの結果として観察された。

すでに、Zip13-KO マウスにおいて、コラーゲン分泌細胞ではゴルジ装置でのコラーゲンの修飾に異常を引き起こすことが報告されている。つまり、Zip13 遺伝子が欠如したコラーゲン分泌細胞では、ゴルジ装置で本来行われるはずのコラーゲン分子の修飾が行われないまま、トロポコラーゲン分子が細胞外に分泌されることを示している。そのみならず、これら大小の粒状構造は、コラーゲンの修飾異常や非コラーゲン性蛋白、特に多糖類の分泌異常も関与している可能性もある。

一方、コラーゲン線維が疎な状態は、反射電子像で層状構造を呈する領域が高石灰化層として観察された領域とよく一致する。したがって、コラーゲン線維が疎な隙間にはハイドロキシアパタイト結晶が密に沈着していることを示している。

Zip13-KO マウスにみられたコラーゲン線維の質的・量的異常については、I 型コラーゲンの関与を検討するため、I 型コラーゲン抗体を用いた免疫染色法を行った。その結果、Zip13-KO マウス象牙質の層状構造の部位に特異的に強い染色反応が観察された。一方、WT マウスではその領域の I 型抗体に対する染色反応は弱かった。このような結果は、抗体に反応するエпитープがコラーゲン分子の異常構造のために露出していたこと考えるのが妥当かもしれない。

本研究では、Zip13 遺伝子が欠損するマウスの象牙質において、分泌された象牙質のコラーゲンの分泌異常による形成異常が認められたが、象牙質の層状石灰化構造は象牙芽細胞によるコラーゲン性基質の分泌量と関連しており、また、質的には象牙芽細胞のゴルジ装置に起因するコラーゲン線維の質的異常による形成不全であった。しかしながら、Zip13 遺伝子は細胞内に 100 種以上あるとされる Zinc-finger をもつ Zip family の遺伝子群の一つであり、その機能に関する全容は明らかにされていないが、明らかに形態学所見からヒト象牙質形成不全症に一致する証左が得られたと考えられる。

以上のことから、本研究で用いた Slc39a13/Zip13 ノックアウトマウスは、コラーゲン線維の質的・量的異常を生じることから、ヒト象牙質形成不全症の病態解明のために有用な疾患モデルマウスとなり得ることが示唆された。