

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890008

研究課題名(和文) 7型コラーゲンKOマウスにおけるエナメル質形成不全発症機構の検索

研究課題名(英文) The analysis of enamel malformation in type VII collagen knockout mice.

研究代表者

浅香 卓哉 (Asaka, Takuya)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80637265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は7型コラーゲンの変異による劣性栄養障害型表皮水疱症におけるエナメル質形成不全の確認と発症機構の解明を目的とした。モデルマウスではエナメル芽細胞からエナメル基質を分泌するトームス突起の構造が未発達であり、エナメル質の基質となるエナメルタンパクの発現低下をモデルマウスで認めた。よって、7型コラーゲンの欠損に伴い、歯胚基底膜中の構造異常が上皮-間葉相互作用に影響し、歯原性上皮細胞からエナメル芽細胞への分化(トームス突起の形成)に障害を起こすと考えられた。さらにエナメル基質の分泌に異常が生じ、立体構造的に欠陥のあるエナメル質が形成され、同患者ではう蝕が進行しやすい可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) is caused by mutations in the gene encoding type VII collagen (COL7), a major component of anchoring fibrils in the epidermal basement membrane zone. We examined the tooth enamel structure of an RDEB patient by scanning electron microscopy. It showed irregular enamel prisms, indicating structural enamel defects. The enamel calcification and chemical composition of Col7a1^{-/-} mice were similar to those of the wild type. However, transverse sections of teeth from the Col7a1^{-/-} mice showed irregular enamel prisms, which were also observed in the RDEB patient. Furthermore, the Col7a1^{-/-} mice teeth had poorly differentiated ameloblasts, lacking normal enamel protein-secreting Tomes processes, and showed reduced mRNA expression of amelogenin and other enamel-related molecules. These findings suggest that COL7 regulates ameloblast differentiation and is essential for the formation of Tomes processes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：7型コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

先天性表皮水疱症は、表皮基底膜の構成タンパクをコードする遺伝子変異により同部位での皮膚の脆弱性がおこり、表皮真皮間の解離が生じて、水疱が形成される常染色体劣性の遺伝性疾患である。裂隙が生じる部位により、表皮中で水疱が生じる単純型(病因分子: keratin5/14)、表皮真皮の結合部が剥離して水疱を発症する接合部型(17型コラーゲン: Col17、Laminin332)、表皮下にて水疱を発症する栄養障害型(7型コラーゲン: Col7)の3つに大別される。

このうち、17型コラーゲンの遺伝子変異により発症する非 Herlitz 型の接合部型表皮水疱症ではエナメル質形成不全を発症することが知られている。北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野では同疾患のモデル動物である17型コラーゲンノックアウトマウス(Col17^{-/-}マウス)と、Col17^{-/-}マウスにヒトのCol17をトランスジェニックしたCol17ヒト化マウスの作成に、世界に先駆けて成功した(Nishie W, et al. Nature Medicine 2007)。

我々は同マウスを用いて、エナメル質形成不全の発症機構の検索し、17型コラーゲンが歯原性上皮細胞からエナメル芽細胞への分化(特にトームス突起の形成)に重要な役割を果たすことを解明し、エナメル質形成不全の発症機構を解明した(Asaka T, et al. Am J Pathol. 2009)。

一方、7型コラーゲンの遺伝子変異により発症する栄養障害型表皮水疱症において、7型コラーゲンの完全欠損症例ではエナメル質形成不全の報告が散見される(Christiano A, et al. Nat Genet. 1993)。しかし、同疾患では口腔粘膜の水疱形成に伴う疼痛による口腔清掃不良が併存しており、齲蝕によるエナメル質への影響を完全に否定することができず、エナメル質形成不全の発症の有無さえも評価困難な状態であった。もちろん、その発症機構についてもこれまで報告されていない。

また、我々が対象とした17型コラーゲンおよび本研究の対象タンパクである7型コラーゲンにおいて、歯牙形成過程における基底膜分子受容体として役割の解明は不十分であり、さらなる研究が希求されている。

2. 研究の目的

本研究の第一目的は、劣性栄養障害型表皮水疱症のエナメル質形成不全の有無について、モデル動物を用いて確認し、さらにエナメル質形成不全を認めたのであれば、その発症機構について、形態学的および分子生物学的な観点から解明することにある。

また、初代培養した歯原性上皮細胞(前エナメル芽細胞)と歯原性間葉細胞(前象牙芽細胞)を用いて3次元培養を行い、両細胞間に構築される基底膜中に17型、7型コラーゲ

ンが認められるのか、また、認められるとすれば、分化過程のどの時期に発現しているのかを生体内と比較検討することで、増殖、分化能についてより詳細な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) Col7a1^{-/-}マウスの譲渡による繁殖および供給環境の整備

本研究には多数のCol7a1^{-/-}マウスを要するため、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野よりCol7a1^{-/-}マウスを譲渡して頂き、実験を円滑に行えるように供給環境を整える。

(2) Col7a1^{-/-}マウス前歯および臼歯の形態学的評価

Col7a1^{-/-}マウスの生存期間は平均1 - 2週間程度である。よって、切歯および臼歯の萌出を認める生後2週令のマウスを対象にして、屠殺後に前歯および臼歯の採取を行い、軟組織を除去し、乾燥後に実態顕微鏡下、走査型電子顕微鏡下にて観察を行う。

(3) Col7a1^{-/-}マウス前歯エナメル質の立体構造の評価

エナメル質はリン酸カルシウム結晶の集合体であるエナメル小柱が規則的に配列することでその基本骨格を形成している。Col17^{-/-}マウスでは、このエナメル小柱の構造と配列の規則性が乱れており、これが脆弱なエナメル質の原因となっている可能性が示唆されている。Col7^{-/-}マウスでも同様の可能性を否定できないため、前歯エナメル質の矢状断を酸処理し、走査型電子顕微鏡下に観察して、立体構造の比較を行う。

(4) エナメル質形成過程における7型コラーゲンの発現時期の観察

エナメル質形成過程において、基底膜は分泌期の一部の時期を除いて前エナメル芽細胞前象牙芽細胞間、エナメル芽細胞エナメル質間で発現している(右図)。基底膜の構成成分である7型コラーゲンについても同時期に発現を認めるのか、生後約1週令の野生型マウス前歯歯胚の矢状断凍結切片を作成し、COL7の免疫染色を行い評価する。

(5) 光学顕微鏡下および透過型電子顕微鏡下におけるエナメル質形成過程の観察

Col7^{-/-}マウス前歯を用いて各エナメル質形成時期に沿って、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡下で形態学的な観察を行う。野生型およびCol7^{-/-}マウスの前歯を含む上下顎骨を採取し、各観察法に従って、固定および脱灰を行い、パラフィンおよびエポキシ樹脂にて包埋後に切片を作成し、観察を行う。

(6) Col7^{-/-}マウスよりエナメル芽細胞を初代培養し、各種エナメル蛋白の発現状態をreal-time PCRを用いて野生型と比較し、その分化能を確認する。

Col7^{-/-}マウス前歯歯胚およびCol7^{-/-}マウス前歯歯胚から初代培養した前エナメル芽細胞からmRNAを抽出し、前エナメル芽細胞からエナメル芽細胞へと分化成熟する過程で

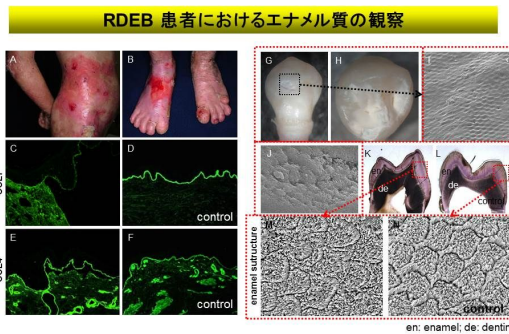
発現される種々のエナメル蛋白 (amelogenin, ameloblastin, enamelin, tuftelin, enamelysin, DSPP) を野生型と比較することで、分化成熟のステージのどの段階で、異常が生じているのかを検討する。これにより、7型コラーゲンのエナメル芽細胞成熟過程での役割が、形態学的な所見と併せて推察できると考えている。

(7) 劣性栄養障害型先天性表皮水疱症患者の歯牙におけるエナメル質の観察。

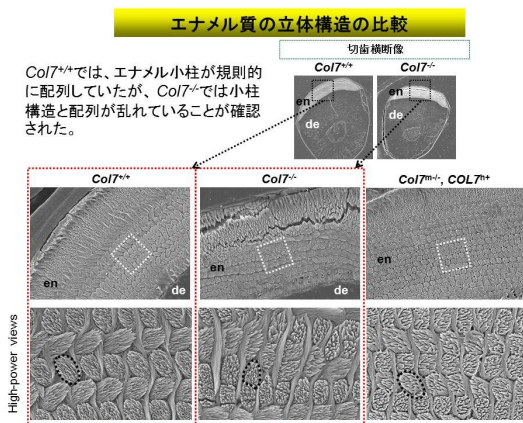
本疾患患者から正常な歯牙を採取することは、不可能と考えている。しかし、本疾患患者の歯牙採取の機会があれば、患者同意の上で、抜去歯牙エナメル質の形態学的な観察を行う。

4. 研究成果

(1) 劣性栄養障害型表皮水疱症モデルマウスの実験に先立ち、同疾患患者におけるエナメル質の形成異常を評価するため、患者抜去歯牙を入手し、エナメル質の走査型電子顕微鏡での評価を行ったところ、エナメル小柱の走行と配列の乱れが確認された。

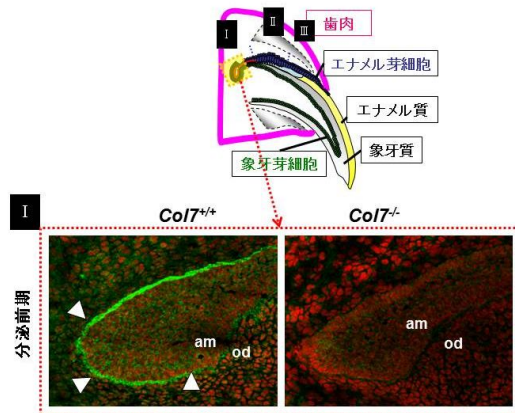


(2) *Col7^{-/-}*マウスの前歯エナメル質を観察したところ、前歯表面における黄褐色の色素沈着低下を認めた。ただし、形態学的な歯牙の異常は認めなかった。また、患者同様にエナメル小柱の走行と配列の乱れが観察された。

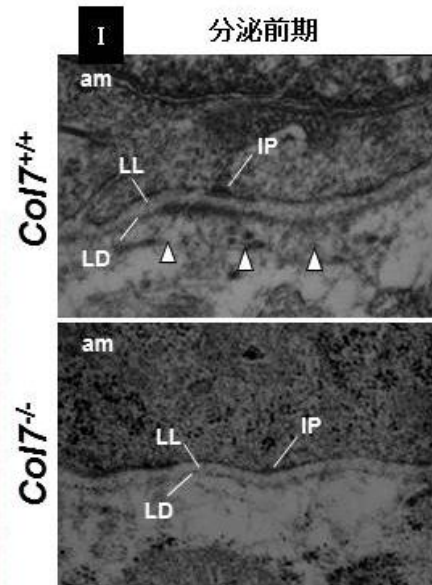


(3) エナメル質形成過程における7型コラーゲンの発現時期について、前歯歯胚を用いた免疫染色で観察したところ、エナメル芽細胞発生初期における分泌前期と分泌期でエ

ナメル芽細胞と象牙芽細胞間に7型コラーゲンの発現が確認され、*Col7^{-/-}*マウスの消失を認めた。

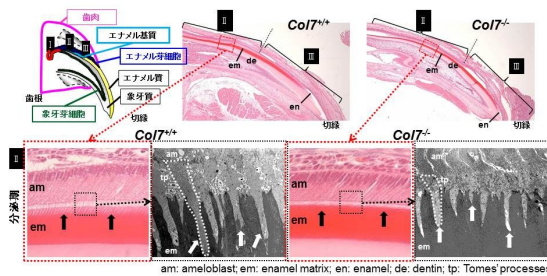


(4) 透過型電子顕微鏡下でも分泌前期のエナメル芽細胞を観察したところ、エナメル芽細胞下と象牙芽細胞間に存在する基底膜と係留線維を認め、*Col7^{-/-}*マウスの消失を認めた。



(5) さらに分泌期および成熟期におけるエナメル芽細胞を光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡下で観察したところ、*Col7^{-/-}*マウスではエナメル芽細胞からエナメル基質を分泌する器官であるトームス突起の構造が未発達であることが観察された。

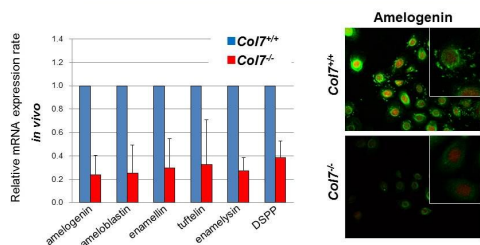
光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡下で観察されたトームス突起の形態異常



(6) 最後に野生型および *Col7^{-/-}*マウスの前歯歯胚および、歯胚から初代培養したエナメル芽細胞において、エナメル質の器質となる

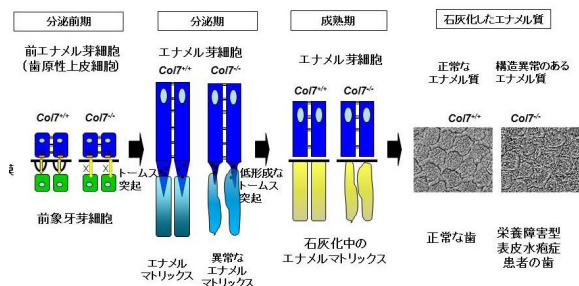
エナメルタンパクの発現を Real time PCR にて比較したところ、歯胚でも培養エナメル芽細胞においても主要なエナメルタンパクの発現の低下が認められた。

エナメル芽細胞分化関連タンパクの発現の比較



(7) まとめ

以上の結果より7型コラーゲンの欠損に伴い、歯胚基底膜中の構造異常が上皮 間葉相互作用に影響を及ぼし、歯原性上皮細胞からエナメル芽細胞への分化(特にトームス突起の形成)に障害を起こすと考えられた。これより、エナメル基質の分泌に異常が生じるため、立体構造的にも欠陥のあるエナメル質が形成されると考えられ、劣性栄養障害型表皮水疱症患者では、エナメル質の立体構造が正常とは異なり、齲蝕が進行しやすい可能性が示唆された。



6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅香 卓哉 (ASAKA Takuya)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80637265

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

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)

[雑誌論文](計1件)

H24年度

Umemoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Shinkuma S, Ito K, Asaka T, Sawamura D, Uitto J, Uo M, Kitagawa Y, Shimizu H. : Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts , *Am J Pathol*, 181(5), 1659-71, 2012. 査読有.

[学会発表](計1件)

H25年度

浅香卓哉: EB における歯牙異常の原因と口腔対策、難治性皮膚ケア学習会、平成 25 年 8 月 10 日、札幌、北海道大学医学部臨床講義棟第 4 講堂