

論文の内容の要旨

論文題目 Parathyroid hormone related peptide (PTHrP) およびその受容体によるラット切歯象牙芽細胞の分化および修復過程の調節

氏名 加藤 淳彦

悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症 (humoral hypercalcemia of malignancy : HHM) の原因物質として同定された副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid Hormone-related peptide : PTHrP) は、その受容体である PTH/PTHrP 受容体 1 (PTHR1) とともにげっ歯類胎児・新生児の歯牙構成細胞に発現する。この PTHrP/PTHR1 軸の機能に関する検討は、同蛋白の遺伝子改変マウスの成長板軟骨細胞層を対象に進展したが、こうした遺伝子改変動物は出生直後に死亡もしくは成長障害を示すため、出生後に完成するげっ歯類の歯牙における PTHrP/PTHR1 軸の機能については未だ不明な点が多い。本研究はこの点を解明する目的で実施した。得られた成果は下記の通りである。

1. 正常成熟ラット歯牙構成細胞の分化過程における PTHrP および PTHR1 の発現

正常成熟ラットの切歯構成細胞における PTHrP および PTHR1 の発現について検討した。

その結果、エナメルおよびセメント芽細胞で PTHrP および PTHR1 の発現が見られ、象牙芽細胞では、未分化間葉系細胞から円柱状象牙芽細胞で両者の共発現が、また高円柱状象牙芽細胞で PTHR1 の発現減弱による PTHrP のみの単独発現が認められた後、後象牙芽細胞で両者ともに消失した。このように、象牙芽細胞の時間的・空間的な移動を伴う分化過程において両蛋白の一過性の発現が認められた。同様の現象は成長板軟骨層で

も報告されており、PTHrP/PTHr1 のこうした発現様式が軟骨細胞の分化調節に寄与することが知られている。以上の結果から、正常成熟ラットの切歯象牙芽細胞でも、両蛋白がその分化調節に関与する可能性が示唆された。

2. 高 PTHrP 血症に伴う癌性高カルシウム血症(HHM)モデルラットに見られる歯牙病変

正常成熟ラット象牙芽細胞では、PTHrP および PTHr1 が一過性に発現することから、これらの蛋白が象牙芽細胞の分化過程で何らかの機能を果たしている可能性が示唆された。この点を検討するため、切歯破切を特徴とする HHM モデルラット (PTHrP 産生腫瘍移植ヌードラット：移植 12 週後) の切歯の HE 染色標本を、対象動物および PTHrP 中和抗体投与動物のそれと比較・検討した。

その結果、HHM モデルラットの切歯に肉眼的な破切が認められた。病理組織学的には、象牙芽細胞の変化を伴わない過石灰化象牙質ならびに象牙芽細胞の変化を伴う象牙質のひ薄化および Dentin niche が認められた。このうち、過石灰化象牙質は、過去の報告にある高 Ca 血症に伴う切歯の変化と同様の組織像および分布を示すことから、本モデルの高 Ca 血症に起因するものと考えられた。これに対し、象牙芽細胞の変化を伴う象牙質の病変は限られた領域に局在することから、何らかの局所因子の関与が推察され、本病変が PTHrP 中和抗体投与により阻止されたことから、この局所因子の候補として PTHrP が考えられた。象牙質のひ薄化に関しては、高円柱状象牙芽細胞の丈の減少を伴っており、同細胞の蛋白分泌能の低下が象牙質のひ薄化を招いたものと考えられた。さらにこの変化が破切部に到達することから、本病変が切歯破切を惹起した可能性が高いものと考えられた。一方、Dentin niche は、細胞障害物質投与時の象牙芽細胞の修復性変化と組織像および分布が酷似していた。しかし、これまでに PTHrP の細胞障害性を指摘した報告は無く、HHM モデルラットの切歯の病変部周辺にも細胞障害性変化は認められなかった。加えて、他臓器ではその修復過程に PTHrP/PTHr1 が関与することを示す報告があることから、本モデルで観察された Dentin niche は、高 PTHrP 血症が、細胞障害を伴うことなく、修復機構のみを稼働させた可能性が考えられた。

3. HHM モデルラットに見られる象牙芽細胞病変の経時的推移

HHM モデルにおける切歯病変を腫瘍移植 2, 5, 8 および 10 週後の時点で観察し、その経時的推移を検討した。

その結果、血中 Ca および PTHrP の濃度上昇が腫瘍移植 5 週後で、切歯破切が腫瘍移植 7 週後で全例の全切歯の特定部に認められた。病理組織学的には、各剖検時点で腫瘍移植 12 週後に認められたのと同じ象牙質・象牙芽細胞病変が観察された。

過石灰化象牙質は、腫瘍移植 5 週後以降に全例で認められ、上記の血中 Ca 濃度の上昇時期と対応していた。高円柱状象牙芽細胞丈の減少を伴う象牙質のひ薄化は腫瘍移植 5 週後以降に見られ、破切以前には破切好発部には存在せず、破切後には全例で病変が同部に到達していたことから、本病変が破切の原因であると結論され

た。さらに、象牙質のひ薄化を惹起した象牙芽細胞丈の減少は、円柱状から高円柱状象牙芽細胞への分化の開始領域から始まり、分化の方向へと拡大していくことが明らかになった。こうした分布が、他組織あるいは胎児象牙芽細胞で報告されている PTHrP/PTHr1 軸への信号の入力に伴う分化の遅延と一致することから、成熟ラットの象牙芽細胞におけるこうした変化の本態は高円柱状象牙芽細胞への分化の遅延であると結論された。さらに、この病変部は、正常成熟ラットで PTHr1 の発現が減弱している領域に一致していた。以上から、正常成熟ラットにおける PTHr1 の発現の減弱と HHM ラットにおける円柱状から高円柱状象牙芽細胞への分化の遅延を関連づけて考察すると、HHM モデルラットの同部での PTHrP あるいは PTHr1 の発現に正常成熟ラットのそれと異なった変化が起こっている可能性が示唆された。

Dentin niche に関しては、移植 10 週後の時点で認められることから、その病変の形成に長期間にわたる高 PTHrP 血症が必要であり、この意味で PTHrP の組織修復機能が特異的に稼動したものと解釈された。以上の結果から、本モデルに見られる Dentin niche 構成細胞に加え、細胞障害性物質投与後に見られる同病変でも PTHrP および PTHr1 が発現し、何らかの機能を果たしている可能性が考えられた。

4. HHM モデルラットに見られる象牙芽細胞病変と PTHrP および PTHr1 の発現との関係

HHM モデルラットに見られる象牙芽細胞の分化の遅延部と正常成熟ラットにおける PTHr1 の発現減弱部が一致することから、HHM モデルラットの同領域では PTHrP あるいは PTHr1 の発現が変化している可能性が考えられた。そこで、対照群に加え、HHM 群（移植 8 週後）および中和抗体投与群で、切歯構成細胞における PTHrP および PTHr1 の発現を検索した。

その結果、対照群では PTHr1 の発現の減弱が高円柱状象牙芽細胞で見られるが、HHM 群では同細胞で PTHr1 の発現の持続と細胞丈の減少が認められた。その他の領域には群間に差は見られず、抗体群での発現は対照群のそれと同一であった。

上記の知見に過去の報告を加味すると、HHM モデルラットで生じた象牙芽細胞の分化の遅延は、高 PTHrP 血症による PTHr1 の発現の持続と、これに伴う PTHrP/PTHr1 軸への持続的な信号の入力により、象牙芽細胞の高円柱化が抑制されたものと解釈された。逆に、正常成熟ラットにおける PTHr1 の発現の減弱は、PTHrP/PTHr1 軸への信号入力を減衰させ、これが持続的な高円柱化を支持する仕組みとして働いているものと考えられた。さらに、HHM モデルラットでは分化の遅延が象牙質のひ薄化を招き、最終的に切歯が破切することから、正常成熟ラットにおける PTHr1 の発現の減弱と象牙芽細胞の高円柱化は、切歯の力学的強度の維持のための仕組みであると考えられた。

なお、HHM 群の 1 例に見られた Dentin niche 構成細胞は、PTHrP および PTHr1 の両者を発現していたことから、少なくとも同病変の形成に PTHrP/PTHr1 軸が関与する可能性が示唆された。

5. 細胞障害性物質投与後に見られる象牙芽細胞修復性変化と PTHrP および PTHR1 の発現との関係

細胞障害性物質によって誘発された Dentin niche の形成過程における PTHrP および PTHR1 の発現を検討するため、Actinomycin D を単回投与し、1, 3 および 7 日後に病変構成細胞における両蛋白の発現を免疫組織化学的に検索した。

その結果、投与 1 日後には、細胞残渣を処理するマクロファージに両蛋白の陽性反応が認められ、投与 3 日後以降の Dentin niche の形成過程では、その構成細胞に両蛋白の高発現が観察されたことから、象牙芽細胞の修復性過程にも、他組織と同様、PTHrP/PTHR1 の関与が示唆された。

以上の成績から、PTHrP/PTHR1 軸は正常成熟ラットの象牙芽細胞の分化過程において、円柱状から高円柱状象牙芽細胞への分化を調節することが明らかとなった。この調節の特徴は PTHR1 の発現の減弱であり、これによる PTHrP/PTHR1 軸への信号入力の減衰が高円柱状化という局所的な変化を支持する仕組みであると考えられ、さらに、この仕組みは、正常成熟ラットで象牙質分泌の亢進とそれに伴う切歯の力学的強度の維持に寄与しているものと考えられた。一方、象牙芽細胞の修復過程でも、その過程に出現する細胞に PTHrP および PTHR1 の発現が確認されたことから、他組織で言われているのと同様に、PTHrP/PTHR1 は、象牙芽細胞の修復過程にも、何らかの役割を果たしているものと考えられた。

以上、本研究で得られた知見から、PTHrP/PTHR1 軸は、正常成熟ラットの象牙芽細胞の分化および修復過程を調節していることが示された。