

<論文の内容の要旨>

Tenomodulin の歯周組織における発現と機能に関する研究

指導教員：高戸 毅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

小宮山 雄介

歯周炎は国民の約半数の人が罹患する疾患であり、デンタルプラークの停滞と局所の細菌感染により引き起こされる感染症である。歯周炎は歯の支持組織を破壊し、やがて歯の脱落を招くことで、咀嚼機能の低下を招き QOL を著しく低下させる。また、歯周炎は歯周組織や歯の喪失をもたらすだけでなく、心内膜炎、アテローム動脈硬化症、虚血性心疾患、肥満、糖尿病、誤嚥性肺炎、低体重児出産などの疾患のリスク因子ともなっている。高齢化社会を迎えたわが国では、歯周炎の克服は予防医学的な観点からも重要な課題である。

歯周炎の初期治療はデンタルプラークの除去を主体としている。初期治療により歯周ポケットの炎症が改善されない場合に、歯周外科処置による歯周ポケット除去が行われる。これは、一度破壊された歯周組織は自然治癒により再生されないことから、ブラッシングの行いやすい歯周環境を構築するために行う。近年注目されている歯周組織再生誘導療法は、炎症により失われた歯周組織を再生することで歯周ポケットを解消することを目的とする治療法である。しかし、この治療法は治癒に至るまでに長期間を必要とし、治療の成否はしばしば患者自身の自己管理に依存する傾向にある。そのため、より効率的な組織再生誘導療法の開発が望まれている。効率的な歯周組織再生誘導療法の開発のためには、歯周組織の発生・恒常性維持のメカニズムに関する詳細な知見が必要である。本研究では、歯周組織の発生・恒常性維持のメカニズムを理解するために歯周組織の発生を特徴づける分子マーカーの探索を行うことを目的としている。

近年、四肢および体幹の強靭結合組織に特異的に発現するタンパク質として、Tenomodulin (Tnmd) が同定された。Tnmd はⅡ型膜貫通タンパク質であり、ノックアウトマウスの腱を電子顕微鏡で観察した結果から、強靭結合組織のコラーゲン細線維の形成に関与する可能性が示されている。さらに、強靭結合組織の発生に中心的な役割を持つと考えられる Scleraxis ノックアウトマウスでは腱・靭帯が発生せず、Tnmd の発現も消失することから、Tnmd が強靭結合組織の成熟に関わると考えられている。歯周靭帯は、歯を顎骨に懸垂・固定し咬合力の緩衝を行う機能を持ち、

強靭結合組織に分類される線維性結合組織である。したがって、歯周靭帯においても Tnmd が組織の成熟に関わる可能性が考えられた。しかし、歯周靭帯を含む頭頸部組織における Tnmd の発現は組織学的に検討されていない。そこで、Tnmd 特異抗体を作製し、これを用いて歯周靭帯における Tnmd の発現を観察した。さらに、マウス胎児線維芽細胞株 NIH3T3 への Tnmd 遺伝子を導入し、Tnmd の機能を細胞生物学的に解析した。本研究では Tnmd の発現・機能を明らかにし、Tnmd の歯周組織の成熟を特徴づける分子マーカーとして検討した。

第 1 章 歯周組織における Tnmd 発現の検討

第 1 章では、Tnmd 特異抗体を作製した。この Tnmd 特異抗体を用いて、NIH3T3 細胞へ Tnmd 遺伝子を導入し、細胞内における Tnmd 局在を検討した。また、歯周組織における発現を免疫組織化学的に検索した。

1-2-1 Tnmd 抗体の作製と抗体反応性の検討

Tnmd の発現を免疫組織化学的に検索するために、Tnmd 特異抗体を作製した。Tnmd 特異抗体の反応性を NIH3T3 細胞へ Tnmd あるいは FLAG 融合 Tnmd 遺伝子を導入して検討した。その結果、抗 Tnmd 抗体および抗 FLAG 抗体を用いて 46 kDa および 42 kDa のバンドを検出し特異性を確認した。糖鎖修飾阻害剤である Tunicamycin、選択的な N-Glycan 切断酵素である PNGaseF を用いた検討から、Tnmd には 2 つの糖鎖が修飾されることがわかった。さらに、抗 Tnmd 抗体を用いたマウス尾組織に対する免疫組織学的検討から抗体の特異性を確認した。

1-2-2 Tnmd の細胞内局在の検討

NIH3T3 細胞に Tnmd 遺伝子導入して Tnmd の細胞内局在の検討した。細胞分画法により Tnmd の発現を膜成分、細胞骨格成分の 2 つの分画で Tnmd を検出した。さらに、Tnmd 遺伝子導入した NIH3T3 細胞における、Tnmd 細胞内局在を免疫組織化学的に検討した。細胞の原形質膜に局在する Pan-cadherin、細胞膜とゴルジ体を描出する WGA (Wheat germ agglutinin)、さらに微小管を構成する Tubulin との共局在を観察した。以上から、細胞内では Tnmd が細胞の原形質膜を中心に局在していることを明らかにした。また、細胞骨格とも関連して局在する可能性が示唆された。

1-2-3 Tnmd の歯周組織における発現の検討

はじめに、マウス下顎切歯を含む組織で切歯周囲の歯周靭帯における *Tnmd* 発現を検討した。下顎切歯を含む組織では歯周靭帯の線維芽細胞、歯髄中の象牙芽細胞、骨膜中の細胞に *Tnmd* の発現を認めた。また、生後 2 週齢から 4 週齢にかけての臼歯萌出期での歯周靭帯における *Tnmd* 発現を検討した。臼歯の歯周靭帯における *Tnmd* の発現は、未萌出の生後 2 週齢では検出されず、咬合開始時期の 3 週齢で *Tnmd* の発現が認められた。この歯周靭帯中の *Tnmd* 発現は、咬合が確立する 4 週齢の時期でも維持されていた。以上より *Tnmd* が、歯周靭帯では歯が萌出した後に咬合を開始する時期に発現が開始することを明らかにした。

第 2 章 *Tnmd* の細胞接着機能の評価

第 2 章では NIH3T3 細胞への *Tnmd* 遺伝子導入の効果として、細胞接着に与える影響について検討した。さらに、*Tnmd* ノックアウト (*Tnmd*^{-/-}) マウス強靭結合組織由来線維芽細胞を用いて *Tnmd* の細胞接着に与える影響を検討した。

2-1 *Tnmd* 発現細胞の細胞形態の検討

NIH3T3 細胞に *Tnmd* 遺伝子を導入した時の細胞形態への影響を検討した。*Tnmd* を強制発現した NIH3T3 細胞では、細胞面積、細胞周径が増加し、多数の細胞突起の伸長がみられることから、細胞形態に影響をおよぼすことが示された。

2-2-2 *Tnmd* の細胞接着に対する影響の評価

Tnmd の細胞接着に与える影響を評価するために、未処理、または collagen、および fibronectin を表面処理した培養プレートへの細胞接着を検討した。*Tnmd* 遺伝子導入した細胞は、GFP コントロールと比較して細胞接着率が増加し、*Tnmd* 発現は細胞接着に関与することがわかった。

2-2-3 *Tnmd* ドメイン欠損変異体による機能ドメインの検討

Tnmd の細胞接着に貢献するドメインを検討するために、*Tnmd* のドメイン欠損変異体を作製した。欠損させたドメインは、C 末端ドメイン (CTD)、BRICHOS ドメイン、および潜在的

なプロセッシング配列を含む領域（CS 領域）とした。Tnmd の CS 領域および BRICHOS ドメインは細胞接着に関与することがわかった。しかし、CTD ドメインは細胞接着を抑制する領域であることがわかった。

2-2-4 Tnmd ^{-/-}細胞を用いた細胞接着効果の検討

Tnmd ^{-/-}細胞、野生型 (+/+) 細胞を用いて、Tnmd の細胞接着に対する効果を検討した。Tnmd ^{-/-}細胞は、COL、FN 表面処理プレートへの細胞接着率が減少した。このことから、Tnmd が細胞接着に関与することがわかり、細胞の細胞外マトリクスに対する接着時に機能する可能性が示唆された。

2-2-5 Tnmd ^{-/-}マウス頭頸部の硬組織形態評価

MicroCT を用いて Tnmd ^{-/-}マウスと +/+マウスの頭頸部硬組織形態と歯数や歯の形態を比較検討した。頭頸部の硬組織および歯数や歯の形態は、Tnmd ^{-/-}マウス、+/+マウスの間で大きさ、形態に大きな変化は認められなかった。

<結論>

本研究では Tnmd の歯周組織における発現とその機能を検討し、6 つの結果を得た。1) 新たに抗 Tnmd 抗体を開発し、Tnmd を 46 kDa, 42 kDa の 2 つのバンドとして検出した。2) Tnmd には N-Glycan が 2 つ修飾されていることを確認した。3) 免疫組織学的検討により、マウス臼歯の歯周靭帯での Tnmd の発現は、歯の萌出後の咬合を開始する時期に起こることを見いだした。4) Tnmd が細胞の原形質膜に局在し、細胞の形態を変化させることを明らかにした。5) Tnmd は、細胞接着の増強に関与することを明らかにした。Tnmd 分子の細胞外領域のうち、CS 領域が細胞接着効果に貢献し、CTD は細胞接着効果に対しては抑制的な作用を示す事を明らかにした。6) Tnmd^{-/-}細胞は、細胞外マトリクスへの細胞接着が減弱することが示唆された。しかし、Tnmd^{-/-}マウスでは+/+と比較して頭頸部硬組織では形態学的に大きな変化は認められなかった。

以上から、Tnmd が細胞接着にかかわり、歯周靭帯では、歯が萌出して咬合圧を受けて機能を開始する時期に発現することが明らかとなった。このことは、Tnmd が歯周靭帯によるセメント質と歯槽骨の機能的な連結に重要である可能性を示唆し、Tnmd が歯周靭帯の成熟を特徴づける分子マーカーであることを示唆している。成熟を特徴付けるマーカーは、組織再生過程においても発現することが推測されることから、本研究を通じて歯周組織再生療法の開発に有益な知見を得る

ことができた。しかし、生体内における Tnmd の詳細な機能とメカニズムは今後さらに解析する必要がある。