

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	松下 貴裕
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 村松 泰徳 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 永山 元彦 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 河野 哲
論文題目 ラット歯胚の成長発育における糖鎖構造改変経路のプロファイル	
論文内容の要旨 【緒 言】 生体を構成する要素として、核酸、タンパク質そして第三の生命鎖と言われる糖鎖が挙げられる。糖鎖の多くは、タンパク質や脂質と複合体を形成し糖タンパク質や糖脂質という形をなし、様々な機能を発揮することが知られており、糖鎖の持つ機能は多岐にわたる。近年糖鎖構造解析技術の進歩により、糖鎖研究は飛躍的に発展している。歯の再生や硬組織形成に関する研究は歯髄幹細胞を用いた象牙芽細胞誘導やリバスクラリゼーションに関する解析が進められており、ヒト歯髄組織を応用する試みも行われている。本研究では、歯胚の成長における糖鎖構造の変化に着目し、歯胚を構成する細胞群の分化過程における糖鎖構造改変経路を解明し、硬組織形成過程における各細胞群の糖鎖構造改変と硬組織形成能との関係を明らかにするとともに、凍結保存歯胚移植実験により、凍結保存および移植操作による糖鎖構造への影響を解析した。 【材料および方法】 1. 歯冠形成期象牙芽細胞における糖鎖構造改変経路 実験には生後 0 日から生後 12 日の Sprague-Dawley (SD) 系幼仔ラット上顎第一臼歯胚を用いた。各週齢の幼仔ラットより上顎骨を摘出し、パラフィン包埋標本を作製した。標本は矢状断連続切片を作製し H-E 染色による組織学的解析、6 種類のビオチン化レクチン (PNA, VVA, SBA, UEA-I, GSL-I, GSL-II) を用いたレクチン染色による糖鎖構造解析を行なった。レクチン染色結果より、Lectin Frontier DataBase (LfDB) 検索を行い、糖鎖構造改変経路を予測した。LfDB 検索により予測した糖鎖構造改変に関与する β -Galactosidase と α 1.3-N-acetyl-galactosaminyl-transferase の発現を組織学的に確認するために、抗 β -Gal 抗体および抗 GBGT1 抗体を用いて免疫染色を行なった。 2. 凍結保存歯胚移植における糖鎖構造改変経路 生後 5 日 SD ラットの歯冠第一臼歯胚を生後 13 日 SD ラットの同部に移植した。移植歯胚は凍結保存歯胚と対照群として非凍結保存歯胚を用いた。移植後 1 週, 2 週, 3 週, 4 週にそれぞれ上顎骨を採取しパラフィン包埋標本を作製した。標本は矢状断連続切片を作製し H-E 染色およびレクチン染色を施した。	

【結 果】

1. 歯冠形成期における糖鎖構造改変経路

レクチン染色において、PNA は歯髓細胞と前象牙芽細胞に染色性を示したが、いずれの週齢においても象牙芽細胞に染色を示さなかった。VVA, SBA, UEA-I, GSL-I はいずれの週齢においても歯髓細胞に染色を示さなかったが、象牙芽細胞に染色を示した。GSL-IIはいずれの細胞群においても染色を示さなかった。

LjDB 検索により、歯髓細胞から象牙芽細胞への分化に伴い、末端の β 1, 3 結合 galactose (Gal) が切断される経路と、GalNAc が付加される経路が予測された。

免疫染色において、抗 β -Gal は、生後 7 日以降において象牙芽細胞の一部で陽性であったが、歯髓細胞、前象牙芽細胞では陰性であった。抗 GBGT1 は、生後 4 日以降において象牙芽細胞の一部で陽性を示したが、抗 β -Gal と同様に、歯髓細胞、前象牙芽細胞では陰性であった。

2. 凍結保存歯胚移植における糖鎖構造改変経路

非凍結歯胚移植群において、VVA, SBA, UEA-I, GSL-I, GSL-IIは正常歯胚におけるレクチン染色結果と同様の染色性を示していたが、PNA は、移植後 2 週および 3 週で象牙芽細胞および歯髓細胞の両方でびまん性に染色されたが、移植後 4 週ではいずれの細胞群においても染色性を示さなかった。凍結保存歯胚移植群では、移植後 1 週で PNA が歯髓細胞に弱く染色されたが、象牙芽細胞には染色性されず、移植後 2 週では、不規則な象牙質形成を認める部位の一部で歯髓細胞および象牙芽細胞に強く染色された。SBA は移植後 1, 4 週の象牙芽細胞で染色されたが、移植後 3 週の PNA 染色歯髓、象牙芽細胞は染色されなかった。

【考 察】

歯髓細胞から前象牙芽細胞、象牙芽細胞へ分化する過程において、PNA の染色は消失し、反対に SBA は歯髓細胞や前象牙芽細胞では染色を示さず、象牙芽細胞の細胞質に特異的な染色を示した。このことから、PNA の特異的に結合する糖鎖構造が SBA の特異的に結合する糖鎖構造へと改変することが示唆された。また LjDB 検索結果より、糖鎖構造の末端において、Gal の切断あるいは GalNAc の付加が示唆された。抗 β -Gal および抗 GBGT1 免疫染色結果より、歯髓細胞から象牙芽細胞への分化には GBGT1 が、象牙芽細胞の成熟には β -Gal が関与することが示唆された。

移植歯胚において、凍結保存後も象牙芽細胞は硬組織形成能を有し、正常歯胚と同様のレクチン染色結果を示したが、移植後 3 週では再度 PNA が染色を示し、4 週では消失したことより、移植操作による影響で糖鎖改変がおこっていることが示唆された。

【結 論】

本研究の結果から、歯髓細胞から象牙芽細胞への分化・成熟過程において、Gal の切断および GalNAc の付加が関与していることが明らかとなった。このように、糖鎖構造改変を調節することで、臨床の場で応用できる可能性が示唆された。