

原 著

## ラットの骨, 象牙質およびセメント質におけるI型コラーゲン C-プロペプチドの局在に関する研究

富澤 康彦, 土谷 昌広, 佐藤 繁久  
高橋 一郎<sup>1</sup>, 土谷 忍<sup>1</sup>, 小牧 健一郎  
秋葉 陽介<sup>2</sup>, 楠 慎一郎<sup>3</sup>, 溝口 到<sup>4</sup>  
笹野 泰之<sup>5</sup>, 渡邊 誠

東北大学大学院歯学研究科 口腔機能形態学講座 加齢歯科学分野

(主任: 渡邊 誠教授)

<sup>1</sup>口腔保健発育学講座 顎口腔矯正学分野

(主任: 山本 照子教授)

<sup>2</sup>The Burke Medical Research Institute

<sup>3</sup>LSL 社

<sup>4</sup>北海道医療大学歯学部 矯正歯科学分野

(主任: 溝口 到教授)

<sup>5</sup>顎口腔創建学講座 顎口腔形態創建学分野

(主任: 笹野 泰之教授)

### Localization of C-propeptide of type-I collagen in mineralized tissues

Yasuhiko Tomizawa, Masahiro Tsuchiya, Shigehisa Sato, Ichiro Takahashi<sup>1</sup>,  
Shinobu Tsuchiya<sup>1</sup>, Ken-ichiro Komaki, Yosuke Akiba<sup>2</sup>,  
Shin-ichiro Kusunoki<sup>3</sup>, Itaru Mizoguchi<sup>4</sup>, Yasuyuki Sasano<sup>5</sup>  
and Makoto Watanabe

*Division of Aging and Geriatric Dentistry, Department of Oral Function and Morphology,  
Tohoku University Graduate School of Dentistry*

(Chief: Prof. Makoto Watanabe)

<sup>1</sup>*Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Health and Development Sciences,  
Tohoku University Graduate School of Dentistry (Chief: Prof. Teruko Yamamoto)*

<sup>2</sup>*Weill Medical College, Cornell University at The Burke Medical Research Institute,*

<sup>3</sup>*LSL Co., Ltd.,*

<sup>4</sup>*Department of Orthodontics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido (Chief: Prof. Itaru Mizoguchi)*

<sup>5</sup>*Division of Craniofacial Development and Regeneration, Department of Craniofacial Engineering  
and Regeneration, Tohoku University Graduate School of Dentistry (Chief: Prof. Yasuyuki Sasano)*

**Abstract:** Type I collagen is most commonly existing protein in mammals and particularly abundant in bone, dentin and connective tissues. The C-propeptide is produced while procollagen molecules which are composed of three pro- $\alpha$  chains are assembled to a collagen fibril. It has been suggested that the C-propeptide plays a role to regulate cell differentiation of osteoblasts. However, there is no information about localization *in vivo* of the C-propeptide in bone and other mineralized tissues such as dentin and cementum. In order to localize the C-propeptide in the mineralized tissues, the present study was designed to investigate their mineralizing processes with immunohistochemistry for the C-propeptide and the type I collagen fibril and with *in situ* hybridization for the procollagen. Anti-C-propeptide antibody stained the matrix-forming region in osteogenesis, dentinogenesis and cementogenesis. In particular, we found the immunoreactivity around Hertwig's epithelial sheath. The localization of the C-propeptide *in vivo* may be involved in function to modify cell differentiation on bone tissue and other mineralized tissues as dentin and cementum.

**Key words:** Type I collagen, C-propeptide, Mineralization

## 緒 言

I型コラーゲンは骨や結合組織、象牙質を構成する細胞外基質成分に豊富に含まれる線維状タンパクで、脊椎動物においては最も豊富に存在するタンパクである<sup>1,2)</sup>。三重鎖らせん構造を成すI型プロコラーゲンは、二本のプロコラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖と一本のプロコラーゲン $\alpha 2(I)$ 鎖により構成される。N末端側から Co-translation された二種類の $\alpha$ 鎖が小胞体へ移行するが、1,000残基以上のアミノ酸からなる長い $\alpha$ 鎖がすべて小胞体へ挿入された後、3本の $\alpha$ 鎖のC-プロペプチド間でS-S結合が作られる。その後、 $\alpha$ 鎖間におけるC末端からN末端方向への会合が進行し、プロコラーゲン分子である3量体が形成される<sup>1,2)</sup>。合成されたI型プロコラーゲン分子は細胞外への分泌直後にプロペプチド領域の修飾を受け、プロコラーゲン分子からコラーゲン分子へと変換される<sup>1,3)</sup>。この修飾はN末端およびC末端部に存在するプロペプチド部分がそれぞれ、a disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin type I domain 2 (ADAMTS-2) や bone morphogenetic protein 1 (BMP-1) といった特異的タンパク分解酵素により切断されるもので<sup>4,5)</sup>、その結果として不溶性となったコラーゲン分子はコラーゲン線維を形成する<sup>1,6)</sup>。すなわち、プロペプチド領域には少なくとも二つの大きな機能、三本鎖コラーゲン分子の細胞内での会合と分泌後のコラーゲン線維形成の調節があると考えられている<sup>1)</sup>。興味深いことに、切断されたC-プロペプチド自体も細胞に対する作用があることが近年明らかとなってきた。その一つとして、線維芽細胞においてはインテグリン受容体を介してコラーゲン産生を制御する、フィードバック機構があることが報告されている<sup>7,8)</sup>。骨芽細胞においても、C-プロペプチドがその分化を制御する作用を持つことが明らかとされており、硬組織形成においても重要な因子である可能性が示されている<sup>9,10)</sup>。

骨や象牙質などのコラーゲン性石灰化組織においては、ハイドロキシアパタイト結晶の成長はコラーゲン線維に沿って起きる<sup>11)</sup>。けれども、コラーゲン自体は結晶の核誘導には働かないことから<sup>12,13)</sup>、コラーゲン線維の石灰化における役割はその『空間』を決定することであると捉えられている<sup>14)</sup>。また、I型プロコラーゲン $\alpha$ 鎖のC-プロペプチド領域における遺伝子変異によっても骨形成不全症が引き起こされることが報告されており<sup>15-17)</sup>、C-プロペプチド領域が硬組織の発達・形成においても深く関与している可能性を示している。しかしながら、C-プロペプチドの *in vivo* における局在に着目し、その動態について明らかとした研究は認められない。

本研究では、抗I型コラーゲンC-プロペプチド抗体を用いた免疫組織染色 (IHC) を行い、骨および象牙質、セメント質といった硬組織領域におけるそれぞれの発現局在について調べた。くわえて、抗I型コラーゲン抗体を用いたIHCとプロコラーゲン $\alpha 2(I)$ 鎖のcRNAプローブを用いた *in situ* hybridization (ISH) を行い、それらの結果と比較検討してC-プロペ

プチドの機能的役割に関する考察を行った。

## 材料と方法

### 1. 実験動物と試料作製

実験に使用した動物は、東北大学動物実験施設の動物飼育ガイドラインに沿って飼育された。また実験は東北大学倫理委員会の承認を得て行われた。

実験には胎生18日齢及び生後2,3週齢のWistar系雄性ラット、各4~5匹を用いた。胎子の試料作製については、母体をジエチルエーテル麻酔下で頸椎脱臼により致死させた後、子宮を切開して取り出した胎児の頭部のみを採取し、以下の行程を経た。生後2,3週齢の下顎骨試料作製については、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg 腹腔内投与) による全身麻酔下で、左心室よりカテーテルを挿入してISH用は4%パラホルムアルデヒド+0.5%グルタルアルデヒド (0.1Mリン酸緩衝液, pH7.4) を、また、IHC用に4%パラホルムアルデヒド (0.1Mリン酸緩衝液, pH7.4) を用いた環流固定を行った。下顎骨を摘出後、同固定液によりさらに12時間、4°Cにて浸漬固定を行った後、10% Ethylene Diamine Tetraacetic acid (EDTA)-0.01 M phosphate buffer saline (PBS, pH7.4) による低温脱灰後、エタノール系列による脱水及びキシレン浸漬を経て、パラフィンに包埋後、厚さ5 $\mu$ mの矢状断連続薄切パラフィン切片を作製した。同様に、脱灰終了後、CMCコンパウンドに包埋し、凍結後、厚さ5 $\mu$ mの矢状断連続薄切凍結切片をphalloidin及びC-プロペプチドの二重染色用に作製した。

観察部位は下顎骨を中心として、ラット第一臼歯の発達に伴って形成されるセメント質および象牙質とし、その相当領域において作製した切片について光学顕微鏡により確認後、以下の行程に使用した。

### 2. 抗体の作製

抗ラットI型コラーゲンC-プロペプチド抗体 (C-pro, LSL社より供与) はラットプロコラーゲン $\alpha 2(I)$ 鎖のC末端アミノ酸配列を基にペプチド (-GCSKKTNEWDKSIIE-) を合成し、multiple antigen peptide (MAP) systemによりウサギを免疫して作製した<sup>18,19)</sup>。その後、抗原を用いたELISA法により抗体の特異性に関する確認を行った。

### 3. 免疫組織染色 (IHC)

基本的な手順については、以前の論文において報告されているプロトコールに準じた<sup>20)</sup>。薄切したパラフィン切片を脱パラフィンした後、PBS-0.1% Triton X (PBS-TX) で洗浄した。次に0.01% protease type XXIV (Sigma, St. Louis, Mo., USA) を用い室温で10分間の酵素処理を行った。PBS-TXで洗浄後、抗ラットI型コラーゲン抗体 (Col I, LSL, Tokyo, Japan, 200倍希釈) もしくはC-pro (100倍希釈) を室温にて2時間反応さ

せた。これらの抗体の希釈は、5% ヤギ血清 (PBS-TX 希釈) により行った。PBS-TX による洗浄後、5% 牛血清アルブミン (PBS-TX 希釈) により 1000 倍希釈した、ヤギ由来 FITC 標識抗ウサギ抗体 (Sigma) と室温にて 1 時間反応させた。先と同様に洗浄後、DAPI (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) にて核染色をした後、Perma-Fluor (DAKO, Santa Barbara, CA, USA) にて封入を行った。F-actin を特異的に認識する phalloidin (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma) を使用した場合、一次抗体処理前に室温にて 1 時間の反応を行った。

#### 4. cRNA プロブの作製

プロコラーゲン  $\alpha 2(I)$  鎖に対する cRNA プロブは RNA labeling kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) において推奨されている方法に沿って作製し、標識として digoxigenin を用いた。制限酵素 (anti-sense プロブ: EcoRV, sense プロブ: BamHI) によるプラスミド切断後、RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* transcription によって cRNA プロブを作製した。

まず、ラット胎仔 limb から抽出した total RNA から Superscript first-strand system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA を作製した。その後、ラットプロコラーゲン  $\alpha 2(I)$  鎖 (747bp; 2,534bp-3,280bp: GenBank NM-053356) に特異的な primer (5'-GGATTTGCTGGCGAGAA-3', 17mer, および 5'-GACCTGGCTACCCTGAGA-3', 19mer) を用いて得られた PCR 産物を、pCR II TOPO vector (Invitrogen) にサブクローニングした。組み込まれたフラグメントについては、制限酵素および DNA シーケンス解析により塩基配列の確認を行った。

#### 5. *in situ* hybridization (ISH)

プロトコールは以前に報告されており<sup>20)</sup>、今回の実験においてもそれに準じた手法で行った。簡単な説明として、薄切片をキシレンにより脱パラフィンした後、PBS にて洗浄した。0.2N HCl で 20 分間処理後、PBS 洗浄を続けて行い、proteinase K (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Roche)-PBS 溶液において 37°C、30 分間の処理を行った。再び洗浄後、切片を 100% エタノールに漬けて脱水、乾燥し、anti-sense もしくは sense プロブを混合した hybridization 溶液 (プロブ濃度; 400 ng/mL) をのせて 45°C、16 時間の条件で反応させた。切片を洗浄し、RNase (Type 1a, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sigma, St. Louis, MO, USA) にて 37°C、30 分間処理した。PBS による洗浄を行った後、核酸検出 Kit (Roche) を用いて反応したプロブを免疫学的手法によって検出した。対比染色としてメチルグリーンによる核染色をした後、Vecta Mount (Vector Laboratories, Burlingame, CA) により封入を行った。

#### 6. 組織学的検討

組織画像 ISH および IHC の画像は光学および蛍光顕微鏡

(AX-80, (株) オリンパス光学, 東京) と共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM, Leica, Heidelberg, Germany) を用い、CCD カメラ (Cool SNAP, 日本ローパー (株), 千葉) により取り込んだ。ISH および IHC の結果から、I 型コラーゲン C-プロペプチドの局在を、I 型コラーゲンの遺伝子発現及びそのタンパクの局在と比較検討を行った。

## 結 果

### 1. 下顎骨形成期における C-プロペプチドの局在について

胎生 18 日齢の下顎領域では、下顎骨の基質形成が進行して石灰化領域が拡大する時期にあたり、メッケル軟骨 (M) 近傍に下顎骨組織の基質形成 (矢頭) が進む。

Col I に対する免疫反応がメッケル軟骨 (M) や一部骨髄領域などを除いて、ほぼ周囲組織全体にわたって確認され、特に下顎骨基質 (矢頭) に明瞭な反応が認められた (図 1-a)。C-pro においても同様に下顎骨基質 (矢頭) において明瞭な免疫反応を認めたが、メッケル軟骨の軟骨細胞においても同程度の免疫反応が検出された (図 1-b)。ISH による所見では、下顎領域において全体的な I 型コラーゲンの発現が認められ、特に下顎骨基質周囲に強い発現を示す細胞の局在が確認された (図 1-c)。メッケル軟骨の軟骨細胞においても、従来の報告と同様に I 型コラーゲンの mRNA の発現は認められた<sup>21)</sup>。

### 2. 歯胚の発達期における C-プロペプチドの局在について

胎生 18 日齢の下顎領域では、第一臼歯の歯胚は帽状期から鐘状期にあたり、エナメル器の構造は明瞭であるが、エナメル質や象牙質の形成は認められない。歯胚周囲には歯周組織に相当する領域の発達が認められ、歯槽骨の骨梁形成が進行している。

Col I に対する強い免疫反応が歯槽骨基質 (矢頭) には認められたものの、エナメル器 (EO) には免疫反応は認められなかった (図 2-a)。C-pro による IHC でも同様に、下顎骨基質相当部 (矢頭) において強い免疫反応が認められたが、エナメル器では免疫反応はみられない (図 2-b)。ISH による所見では、歯槽骨形成領域の細胞 (矢頭) で特に強い I 型コラーゲン発現が確認された (図 2-c)。

### 3. 歯冠形成期における C-プロペプチドの局在について

ラット第一臼歯は 2 週齢においては歯冠完成期から歯根形成期にあたり、ヘルトウィッチ上皮鞘の構造が認められる。すなわち、象牙質の活発な形成とセメント芽細胞の分化が活発な時期に相当する<sup>22)</sup>。

Col I に対する免疫反応は、ヘルトウィッチ上皮鞘 (矢頭) や象牙質を除いた組織において全体的に観察された (図 3-a)<sup>23)</sup>。C-pro に対する免疫反応は象牙前質、特に形成面において強く認められた。また、上皮鞘 (矢頭) を取り囲むように明瞭な免疫反応が認められた (図 3-b)。ISH による所見では、象牙芽

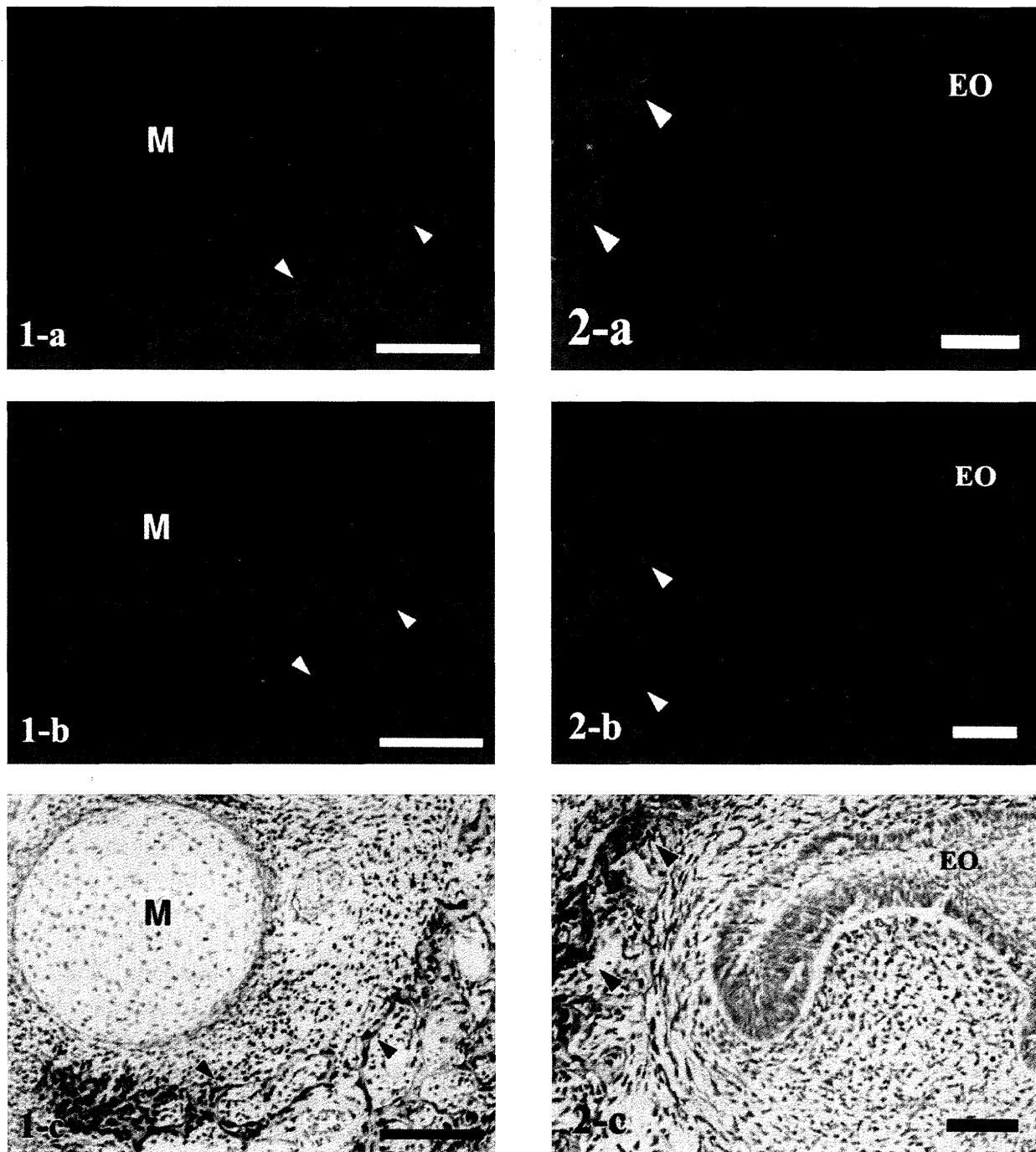


図1. 下顎骨形成期における IHC および ISH の組織像  
胎生 18 日齢の下顎領域では、メッケル軟骨 (M) とその周囲における下顎骨の基質形成が認められる。(a) Col1 では下顎骨基質 (矢頭) に強い免疫反応が認められる。メッケル軟骨には反応は認められない (b) C-pro では下顎骨基質 (矢頭) に加え、メッケル軟骨 (M) においても免疫反応が認められる (c) プロコラーゲン  $\alpha 2$  (I) 鎖に対する ISH では、組織全体的な発現が認められるが、特に形成過程にある骨基質周囲に強い発現が示された。メッケル軟骨においても発現が認められる (M: メッケル軟骨, Bar=100  $\mu$ m)

図2. 歯胚の発達期における IHC および ISH の組織像  
胎生 18 日齢の下顎領域では、帽状期から鐘状期に相当する第一臼歯のエナメル器 (EO) が観察される。エナメル質や象牙質の形成は認められない。歯胚周囲には歯周組織に相当する領域の発達が認められ、歯槽骨の骨梁形成が進行している。(a) Col1 では強い免疫反応が歯槽骨基質 (矢頭) には認められるが、エナメル器 (EO) では認められない (b) 歯槽骨基質 (矢頭) において強い免疫反応が認められたが、エナメル器 (EO) では免疫反応はみられない (c) プロコラーゲン  $\alpha 2$  (I) 鎖に対する ISH では、歯槽骨形成領域の細胞 (矢頭) で特に強い I 型コラーゲン発現が確認されるが、エナメル器 (EO) では認められない (EO: エナメル器, Bar=100  $\mu$ m)

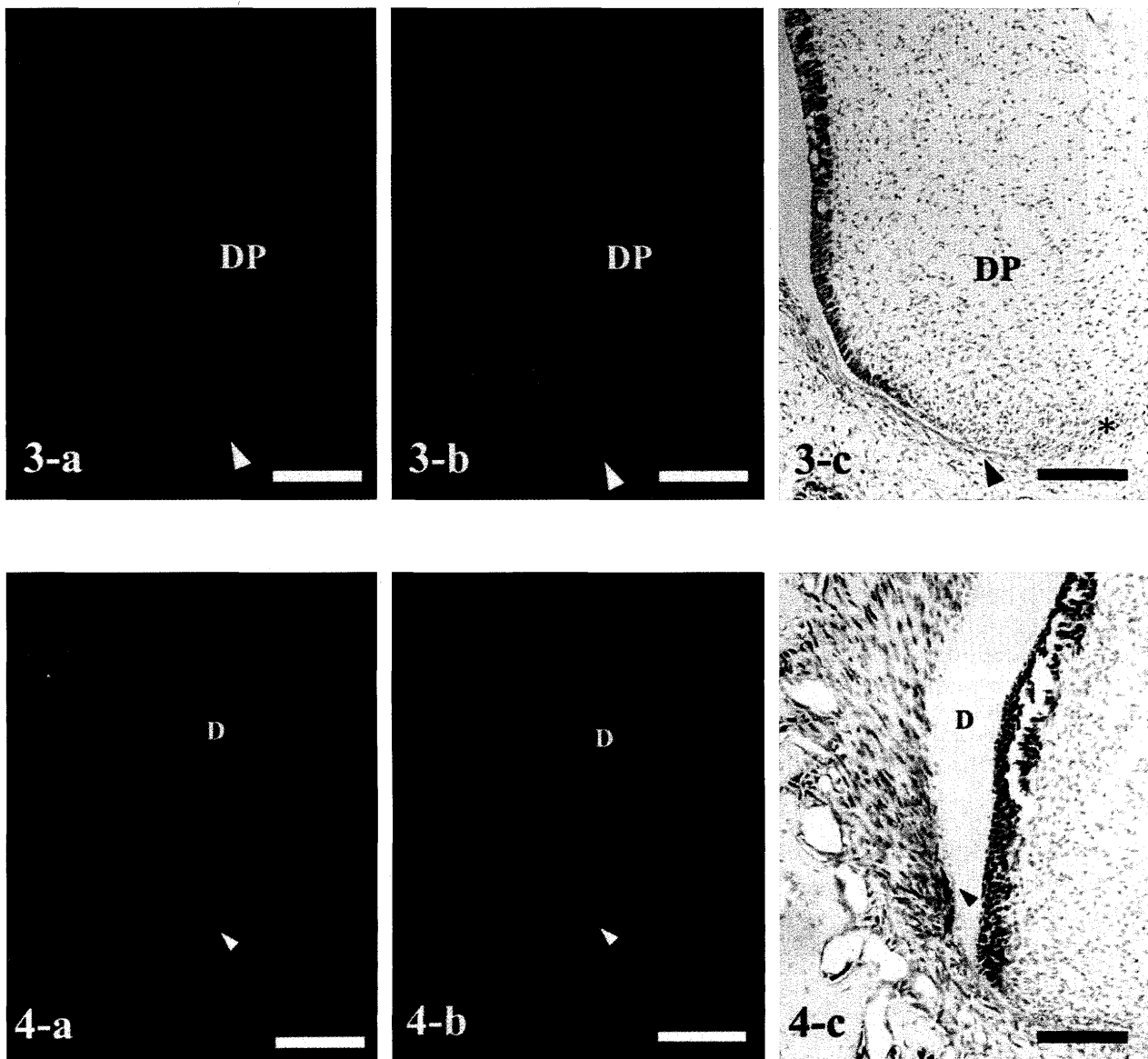


図 3. 歯冠形成期における IHC および ISH の組織像

2 週齢では、ラット第一臼歯は歯冠完成期から歯根形成期にあたり、ヘルトウィッチ上皮鞘の構造が認められる。象牙質の活発な形成とセメント芽細胞の分化が活発な時期に相当する。(a) Col I ではヘルトウィッチ上皮鞘 (矢頭) を除き、免疫反応が全体的に観察される (b) C-pro では象牙前質、特に形成面において強い免疫反応が認められるだけでなく、上皮鞘 (矢頭) を取り囲むような明瞭な免疫反応がみられる (c) プロコラーゲン  $\alpha 2(I)$  鎖に対する ISH では、象牙芽細胞に強い反応が認められ、上皮鞘の先端部周囲 (asterisk) においても発現が認められる (DP: 歯髄, Bar=100  $\mu$ m)

図 4. セメント質形成における IHC および ISH の組織像

3 週齢のラット第一臼歯は、セメント質の形成開始期に相当する。(a) Col I では、組織全体にわたる免疫反応が観察され、特に類骨、象牙前質およびセメント前質において強い反応が認められる (b) C-pro では類骨、象牙前質に加えて歯根象牙質の根尖側表層部 (矢頭) において認められる (c) プロコラーゲン  $\alpha 2(I)$  鎖に対する ISH では、象牙芽細胞や骨芽細胞、そして歯根象牙質の根尖側表層部に局在する細胞 (矢頭) において強い発現が確認される (D: 象牙質, Bar=100  $\mu$ m)

細胞に強い反応が認められた。上皮鞘の先端部周囲において、顕著な I 型コラーゲンの発現を示す細胞の凝集 (asterisk) が認められた (図 3-c)。

#### 4. 歯根形成期における C-プロペプチドの局在について

3 週齢のラット第一臼歯は、歯根象牙質表層においてオステ

オカルシンや I 型コラーゲンを強く発現する細胞が確認され、特に象牙質根尖側においては有細胞セメント質の形成開始の時期に相当する<sup>22)</sup>。

Col I に対する免疫反応は組織全体にわたって観察され、類骨および象牙前質において強い反応が認められた (図 4-a)。C-pro に対する顕著な反応は、象牙前質、類骨に加えて歯根象

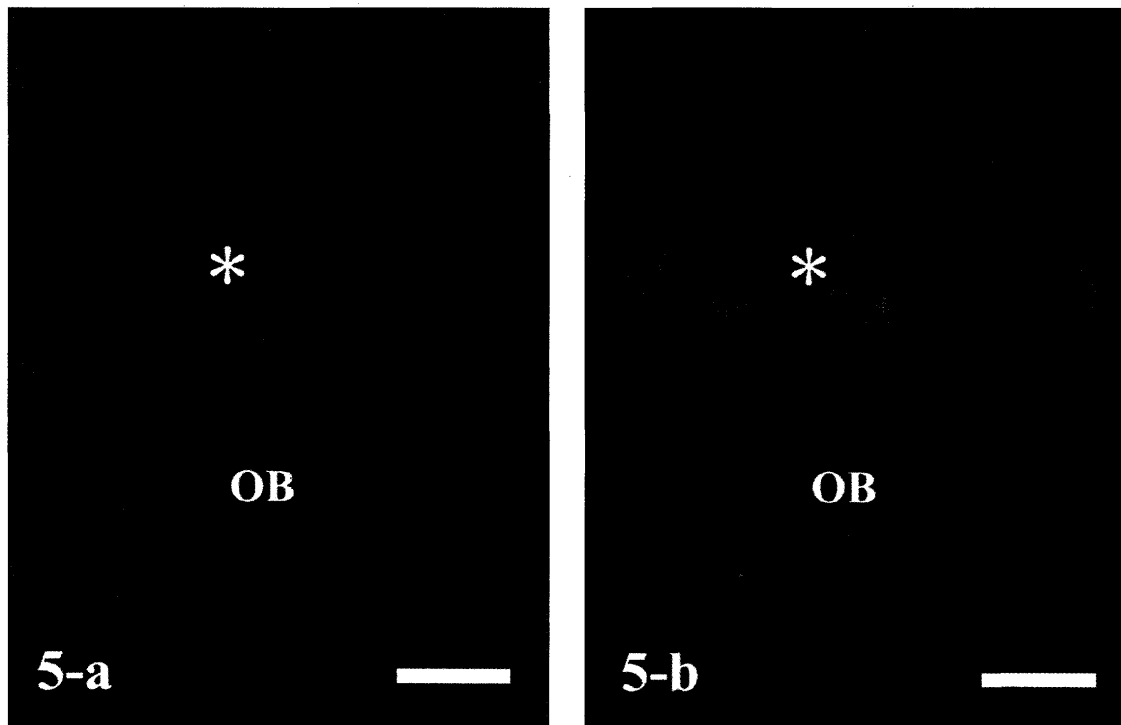


図5. Phalloidin (赤) と C-pro (緑) の比較  
3週齢のラット第一臼歯の象牙質において観察された。C-pro (緑) の象牙前質における局在 (asterisk) は象牙芽細胞 (赤) とは一致しない (a) phalloidin (赤) は細胞骨格, F-actin を認識する (b) C-pro (緑) は象牙前質において局在を示す (asterisk) (青色: DAPI による核染色, OB: 象牙芽細胞, Bar=15  $\mu$ m)

牙質の根尖側表層部(矢頭)において認められた(図4-b)。ISHによる所見では、象牙芽細胞や骨芽細胞、そして歯根象牙質の根尖側表層部に局在する細胞(矢頭)において強い発現が確認された(図4-c)。

##### 5. phalloidin と C-プロペプチドの比較

C-プロペプチドの集積が細胞外であることを確認するため、細胞骨格であるF-actinを認識するphalloidinを用いて、二重組織化学染色を行った。組織としては、細胞外基質—細胞間の境界が明瞭な象牙前質を対象とした。象牙前質におけるC-proの免疫反応の局在(asterisk)は、象牙芽細胞の細胞突起とは一致していなかった(図5-a, 図5-b)。

## 考 察

硬組織形成過程におけるC-プロペプチドの局在が認められた領域に関して、Col Iを用いたIHC、およびプロコラーゲン $\alpha 2(I)$ 鎖に対するISHとの比較検討を行い、Col IとそのmRNAの両方がともに検出された領域とmRNAは検出されてもCol Iが検出されない領域の2つに大きく分けられた。前者は類骨、象牙前質およびセメント前質が顕著な例として挙げられ、全てI型コラーゲンを主体とした細胞外基質が急速に形成される領域に相当すると考えられる<sup>22-24)</sup>。後者については、本研究の結果として、メッケル軟骨が挙げられる。

I型コラーゲンのN-およびC-プロペプチドは、分泌直後に特異的なタンパク分解酵素による切断で産生され<sup>45)</sup>、血中へと移行したのち肝臓において代謝されると考えられているが<sup>25)</sup>、組織から血中への動態について示した研究は認められない<sup>12)</sup>。切断されたC-プロペプチドが類骨、象牙前質およびセメント前質などの硬組織形成領域において集積していることを明らかとした。我々は以前の研究において、抗I型コラーゲンC-プロペプチド抗体が象牙芽細胞内のI型プロコラーゲンを認識することを示した<sup>26)</sup>。本研究では免疫反応の細胞内外の局在について検討を行うため、細胞骨格に対する組織化学染色を並行して行った(図5)<sup>27)</sup>。コラーゲン産生が活発な硬組織形成期においても、生理的狀態下ではプロコラーゲン分子が細胞外ではほとんど存在しないとの報告からも<sup>11,28)</sup>、本研究で示した細胞外における免疫反応はC-プロペプチドに対するものであると考えられる。また、本研究の結果は象牙芽細胞やセメント芽細胞から産生されるC-プロペプチドの量が、骨芽細胞の場合と同様に硬組織形成細胞としての活性を反映するものであることを示している。

C-プロペプチドが骨芽細胞の分化に関して抑制的な作用を持ち、骨芽細胞のコラーゲン合成やアルカリフォスファターゼ活性を減少させることが*In vitro*の研究において報告されている<sup>9,10)</sup>。水野らは考察として、C-プロペプチドが前駆細胞の分化を調節し、結果的に骨組織の発達を制御している可能性について示している。しかしながら、細胞外におけるC-プロペ

チドの動態については明らかとなっていない。本研究では類骨における C-プロペプチドの集積を示しただけでなく (図 1, 2), 象牙前質やセメント前質においても同様の傾向が認められることを明らかとした (図 4, 5)。くわえて, 象牙芽細胞やセメント芽細胞の分化が顕著なヘルトウィッチ上皮鞘周囲に C-プロペプチドの集積が認められることを示し (図 3), 骨芽細胞と同様に C-プロペプチドによる分化の調節が象牙芽細胞やセメント芽細胞においても働いている可能性を示した。

メッケル軟骨の軟骨細胞では mRNA レベル, C-プロペプチドの免疫反応の両方でその発現が確認された。しかしながら, I 型コラーゲンの局在については IHC では確認されず, コラーゲン線維の形成が起きていない可能性を示している。本研究で用いた胎生 18 日齢のメッケル軟骨では, 軟骨細胞が脱分化することで I 型コラーゲンを発現することが報告されている<sup>20)</sup>。この時期のメッケル軟骨では同時にコラゲナーゼやゼラチナーゼの発現も高いことから<sup>29)</sup>, 産生された I 型コラーゲン分

子が線維形成前に分解されている可能性が考えられる。

本研究においては抗 I 型コラーゲン C-プロペプチド抗体を用い, 硬組織発達領域におけるその発現局在について調べ, 抗 I 型コラーゲン抗体を用いた IHC やプロコラーゲン  $\alpha 2(I)$  鎖の cRNA プローブを用いた ISH との比較検討を行った。結果として, 類骨, 象牙前質およびセメント前質といった, I 型コラーゲンの発現が高い硬組織形成領域において C-プロペプチドの集積が認められることを示し, *in vitro* の研究において報告されている, C-プロペプチドの機能的役割が *in vivo* においても働いている可能性を示した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 本研究に御助力頂きました本研究科加齢歯科学分野教員各位に心より感謝いたします。

**内容要旨:** I 型コラーゲンは骨や結合組織, 象牙質に豊富に含まれる線維状タンパクである。I 型コラーゲン C-プロペプチドはコラーゲン分子への変換に伴って産生され, コラーゲン分子の会合とコラーゲン線維形成にとって必須である。近年, C-プロペプチド単体に様々な作用があることが報告され, 特に *in vitro* において硬組織形成に関与する前駆細胞の分化に抑制的に働くことが報告されている。つまり, 硬組織の発達・形成過程での重要性が示されているが, *in vivo* における C-プロペプチドの局在については明らかとなっていない。本研究では, 抗 I 型コラーゲン C-プロペプチド抗体を用いた免疫組織染色を行い, 骨および象牙質, セメント質といった硬組織領域における, それぞれの発現局在について調べ, 抗 I 型コラーゲン抗体を用いた IHC とプロコラーゲン  $\alpha 2(I)$  鎖の cRNA プローブを用いた *in situ* hybridization の結果と比較検討した。胎生期における下顎骨発生, および歯牙の発生過程における C-プロペプチドの局在から, 骨, 象牙質およびセメント質の活発な形成時期にはその基質において集積が認められた。くわえて, ヘルトウィッチ上皮鞘周囲に認められた I 型コラーゲン C-プロペプチドの集積の所見からも, すでに報告されている分化調節機構が骨組織のみならず, 象牙質やセメント質の発達過程においても重要である可能性が示された。

## 文 献

- 1) Alberts B, B.D., Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Watson, J.D.: Molecular biology of the cell, 4th ed. Garland Publishing, Inc., New York, London, 2002, pp. 978-984.
- 2) Myllyharju, J.: Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol* **22**(1): 15-24, 2003.
- 3) Leblond, C.P.: Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone, and dentin. *Anat Rec* **224**(2): 123-138, 1989.
- 4) Cabral, W.A., Makareeva, E., Colige, A., Letocha, A.D., Ty, J.M., Yeowell, H.N., Pals, G., Leikin, S., Marini, J.C.: Mutations near amino end of alpha 1(I) collagen cause combined osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome by interference with N-propeptide processing. *J Biol Chem* **280**(19): 19259-19269, 2005.
- 5) Moali, C., Font, B., Ruggiero, F., Eichenberger, D., Rouselle, P., Francois, V., Oldberg, A., Bruckner-Tuderman, L., Hulmes, D.J.: Substrate-specific modulation of a multisubstrate proteinase. C-terminal processing of fibrillar procollagens is the only BMP-1-dependent activity to be enhanced by PCPE-1. *J Biol Chem* **280**(25): 24188-24194, 2005.
- 6) Lamande, S.R., Bateman, J.F.: Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin Cell Dev Biol* **10**(5): 455-464, 1999.
- 7) Weston, S.A., Hulmes, D.J., Mould, A.P., Watson, R.B., Humphries, M.J.: Identification of integrin alpha 2 beta 1 as cell surface receptor for the carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen. *J Biol Chem* **269**(33): 20982-20986, 1994.
- 8) Davies, D., Tuckwell, D.S., Calderwood, D.A., Weston, S.A., Takigawa, M., Humphries, M.J.: Molecular characterisation of integrin-procollagen C-propeptide interactions. *Eur J Biochem* **246**(2): 274-282, 1997.
- 9) Mizuno, M., Fujisawa, R., Kuboki, Y.: Carboxyl-terminal propeptide of type I collagen (c-propeptide) modulates the action of TGF-beta on MC3T3-E1 osteoblastic cells. *FEBS Lett* **479**(3): 123-126, 2000.
- 10) Mizuno, M., Fujisawa, R., Kuboki, Y.: The effect of carboxyl-terminal propeptide of type I collagen (c-propeptide) on collagen synthesis of preosteoblasts and osteoblasts.

- Calcif Tissue Int **67**(5) : 391-399, 2000.
- 11) Karim, A., Courmil, I., Leblond, C.P. : Immunohistochemical localization of procollagens. II. Electron microscopic distribution of procollagen I antigenicity in the odontoblasts and predentin of rat incisor teeth by a direct method using peroxidase linked antibodies. *J Histochem Cytochem* **27**(7) : 1070-1083, 1979.
  - 12) Landis, W.J. : The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* **16**(5) : 533-544, 1995.
  - 13) George, A., Bannon, L., Sabsay, B., Dillon, J.W., Malone, J., Veis, A., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. : The carboxyl-terminal domain of phosphoryn contains unique extended triplet amino acid repeat sequences forming ordered carboxyl-phosphate interaction ridges that may be essential in the biomineralization process. *J Biol Chem* **271**(51) : 32869-32873, 1996.
  - 14) Veis, A. : Materials science. A window on biomineralization. *Science* **307**(5714) : 1419-1420, 2005.
  - 15) Pace, J.M., Chitayat, D., Atkinson, M., Wilcox, W.R., Schwarze, U., Byers, P.H. : A single amino acid substitution (D1441Y) in the carboxyl-terminal propeptide of the proalpha 1(I) chain of type I collagen results in a lethal variant of osteogenesis imperfecta with features of dense bone diseases. *J Med Genet* **39**(1) : 23-29, 2002.
  - 16) Pihlajaniemi, T., Dickson, L.A., Pope, F.M., Korhonen, V.R., Nicholls, A., Prockop, D.J., Myers, J.C. : Osteogenesis imperfecta: cloning of a pro-alpha 2(I) collagen gene with a frameshift mutation. *J Biol Chem* **259**(21) : 12941-12944, 1984.
  - 17) Pollitt, R., McMahon, R., Nunn, J., Bamford, R., Afifi, A., Bishop, N., Dalton, A. : Mutation analysis of COL1A1 and COL1A2 in patients diagnosed with osteogenesis imperfecta type I-IV. *Hum Mutat* **27**(7) : 716, 2006.
  - 18) Tam, J.P. : Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(15) : 5409-5413, 1988.
  - 19) Chang, L., Binos, S., Savige, J. : Epitope mapping of anti-proteinase 3 and anti-myeloperoxidase antibodies. *Clin Exp Immunol* **102**(1) : 112-119, 1995.
  - 20) Sasano, Y., Furusawa, M., Ohtani, H., Mizoguchi, I., Takahashi, I., Kagayama, M. : Chondrocytes synthesize type I collagen and accumulate the protein in the matrix during development of rat tibial articular cartilage. *Anat Embryol (Berl)* **194**(3) : 247-252, 1996.
  - 21) Ishizeki, K., Kubo, M., Yamamoto, H., Nawa, T. : Immunocytochemical expression of type I and type II collagens by rat Meckel's chondrocytes in culture during phenotypic transformation. *Arch Oral Biol* **43**(2) : 117-126, 1998.
  - 22) Sasano, Y., Maruya, Y., Sato, H., Zhu, J.X., Takahashi, I., Mizoguchi, I., Kagayama, M. : Distinctive expression of extracellular matrix molecules at mRNA and protein levels during formation of cellular and acellular cementum in the rat. *Histochem J* **33**(2) : 91-99, 2001.
  - 23) Andujar, M.B., Couble, P., Couble, M.L., Magloire, H. : Differential expression of type I and type III collagen genes during tooth development. *Development* **111**(3) : 691-698, 1991.
  - 24) Rodan, G.A., Noda, M. : Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **1**(2) : 85-98, 1991.
  - 25) Tanaka, Y., Kitajima, I. : [Carboxy-terminal propeptide of type I procollagen (PICP)]. *Nippon Rinsho* **62** Suppl **12** : 244-246, 2004.
  - 26) Sato, S. : Localization of procollagen alpha2(I) in odontoblasts during dentinogenesis Tohoku Univ. Dent. *J* **25**(1) : T31-T37, 2006.
  - 27) Tsuchiya, M., Sasano, Y., Kagayama, M., Watanabe, M. : The extent of odontoblast processes in the dentin is distinct between cusp and cervical regions during development and aging. *Arch Histol Cytol* **65**(2) : 179-188, 2002.
  - 28) Sodek, J., Mandell, S.M. : Collagen metabolism in rat incisor predentine in vivo: synthesis and maturation of type I, alpha 1 (I) trimer, and type V collagens. *Biochemistry* **21**(9) : 2011-2015, 1982.
  - 29) Sakakura, Y., Hosokawa, Y., Tsuruga, E., Irie, K., Nakamura, M., Yajima, T. : Contributions of matrix metalloproteinases toward Meckel's cartilage resorption in mice: immunohistochemical studies, including comparisons with developing endochondral bones. *Cell Tissue Res* **328**(1) : 137-151, 2007.
  - 30) Camper, L., Heinegard, D., Lundgren-Akerlund, E. : Integrin alpha2beta1 is a receptor for the cartilage matrix protein chondroadherin. *J Cell Biol* **138**(5) : 1159-1167, 1997.
  - 31) Palmieri, D., Camardella, L., Ulivi, V., Guasco, G., Manda, P. : Trimer carboxyl propeptide of collagen I produced by mature osteoblasts is chemotactic for endothelial cells. *J Biol Chem* **275**(42) : 32658-32663, 2000.