

## 最近のトピックス

## 歯の形態形成と細胞分化における TIMP-1, -2, -3 の mRNA とタンパクの発現 Temporospatial gene expression and protein localization of TIMP-1, -2, and -3 during mouse tooth development

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
口腔健康科学講座 歯学分野

吉羽 永子, 吉羽 邦彦, 興地 隆史

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics,  
Department of Oral Health Science, Course of Oral life science,  
Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences  
Nagako Yoshiba, Kunihiko Yoshiba, Takashi Okiji

### 【目 的】

細胞外基質のリモデリングは、器官形成及び細胞分化を調節する重要な因子である。このリモデリングは matrix metalloproteinases (MMPs) と tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) のバランスによりコントロールされている。一方 TIMPs は、そのインヒビターとしての作用とは全く異なった機構を介して、細胞増殖、細胞分化、アポトーシスなどに関する多彩な機能を有していることが広く認識されるようになってきた<sup>1)</sup>。マウス臼歯発生過程での TIMP-1, -2, -3 と MMP-2, -9, MT1-MMP (membrane type 1-MMP) の発現を検索したところ、MMPs に関しては類似の発現パターンを示す一方で、TIMPs の発現は時間的空間的に全く異なって制御されていることが明らかとなった<sup>2)</sup>。

マウス切歯は臼歯と異なり一生涯萌出し続けることのできる常生歯であり、これは形成端であるアピカルループあるいはアピカルパッドという部位に歯の幹細胞が存在するためと考えられている。我々は TIMP-1, -2, -3 の役割を解明する目的で、マウス切歯をモデルとして、その発生過程、細胞分化及び基質形成期におけるこれらの発現を検索した。

### 【方 法】

マウス歯胚上皮の陥入初期にあたる胎生 13 日 (E13) から、その形態の原型がほぼ完成し、基質形成が盛んに認められる生後 2 日 (P2) にいたる未固定未脱灰凍結切片を作成した。TIMP-1, -2, -3 それぞれに対する <sup>35</sup>S 標識 cRNA プローブを用いた in situ hybridization と特異抗体を用いた免疫染色を行った。

### 【結果および考察】

マウス切歯形態形成、細胞分化、及び基質形成過程において、TIMP-1, -2, -3 は時間的空間的にそれぞれ全く異なった発現パターンを示し、臼歯発生過程とも異なるものであった<sup>3)</sup>。

1. TIMP-1 は上皮-間葉接合部で特徴的な局在を示す  
TIMP-1 タンパクは発生初期から歯胚基底膜に連続して認められた。P2 においてアピカルループ基底膜では豊富に認められる TIMP-1 タンパクは、エナメル芽細胞の分化が開始されると基底膜から消失し、分泌期エナメル芽細胞遠心端に沿って再びタンパクの局在が観察された。この、上皮-間葉接合部に認められる TIMP-1 の発現パターンは、先に報告した laminin-5 の発現パターンとよく一致する<sup>4)</sup>。Laminin-5 は上皮組織に発現し、上皮細胞のアポトーシスを抑制する因子として知られている。一方、TIMP-1 はその固有のシグナルを介して抗アポトーシス効果を有していることが報告されている。これらのことから、歯胚上皮-間葉接合部に局在する TIMP-1 はエナメル器のアポトーシスを回避している可能性が示唆される。

2. TIMP-2 は特定の組織の細胞外基質に局在している  
歯の発生過程において TIMP-2 タンパクはかなりユニークな発現パターンを示していた。

基底膜での発現をみると、臼歯発生過程では上皮陥入初期から E16 までの間に、舌側の基底膜に TIMP-2 が認められ (図 1 A)、その後、臼歯歯胚基底膜での TIMP-2 は観察されなくなる。一方、切歯基底膜では E16 からアピカルループに認められ、P2 においてもその局在は観察された (図 1 B)。最近になって、TIMP-2 の細胞増殖を制御する受容体機構の一つが明らかとなっ

ている。すなわち、TIMP-2 タンパクはインテグリン  $\alpha 3 \beta 1$  と直接結合し、そのシグナルが FGFR-1 などのチロシンキナーゼ受容体に作用することで、血管内皮細胞の増殖を down-regulate していることが報告されている<sup>5)</sup>。白歯上皮におけるインテグリン  $\alpha 3$  は TIMP-2 と同様なパターンで舌側上皮細胞に発現されており、また、切歯においてもアピカルループにインテグリン  $\alpha 3$  が認められた(未発表データ)。この基底膜に観察される TIMP-2 は、同様な機構で歯性上皮細胞の増殖を制御している可能性が示唆される。

一方、TIMP-2 は E13 から歯小囊において mRNA、タンパクともに強く発現し続け、P2 においても強い発現が認められた(図 1 B)。TIMP-2 はコラーゲン合成を up-regulate していることが報告されている。歯小囊は発生初期からコラーゲンが豊富な組織であることから、歯小囊で発現される TIMP-2 はその組織化に関与していると思われる。

### 3. 歯の幹細胞との関わりが示唆される TIMP-3

歯胚上皮の嵌入先端にあたる部分はサービカルループと呼ばれる。マウス切歯では舌側に位置するサービカルループは特にアピカルループと呼ばれ、ここに歯の幹細胞を保持し続けると考えられている。マウス切歯発生過程における Timp-3 mRNA の発現パターンは白歯とは全く異なっており、その違いの一つはサービカルループを取り囲む間葉組織に認められた。歯胚上皮陥入初期から、アピカルループを取り囲む間葉細胞は Timp-3 mRNA を強く発現し続けるが、白歯発生過程では、サービカルループを取り囲む間葉組織は Timp-3 mRNA を発現しない。

基質形成が進むと Timp-3 mRNA は象牙芽細胞下層に強く発現し、そのタンパクは象牙芽細胞下層及び象牙芽細胞間に分布する。未分化な歯乳頭細胞が分裂し、歯胚上皮の影響を受けた細胞が象牙芽細胞に分化し、もう

一方の娘細胞は象牙芽細胞下層に存在し続けると考えられている。現在のところ、象牙芽細胞下層における TIMP-3 の役割は不明であり、歯の幹細胞との関わりも含め、さらに検討を行う予定である。

### 【参考文献】

- 1) Baker AH, Edwards DR and Murphy G: Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, 115: 3719-3727, 2002.
- 2) Yoshida N, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV and Lesot H: Temporospacial gene expression and protein localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors during mouse molar tooth development. *Dev Dyn*, 228: 105-112, 2003.
- 3) Yoshida N, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV, Hosoya A, Ozawa H and Lesot H: Differential regulation of TIMP-1, -2, and -3 mRNA and protein expressions during mouse incisor development. *Cell Tissue Res*, 324: 97-104, 2006.
- 4) Yoshida K, Yoshida N, Aberdam D, Meneguzzi G, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Ruch JV and Lesot H: Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. *Dev Dyn*, 211: 164-176, 1998.
- 5) Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY and Stetler-Stevenson WG: TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell*, 114: 171-80, 2003.

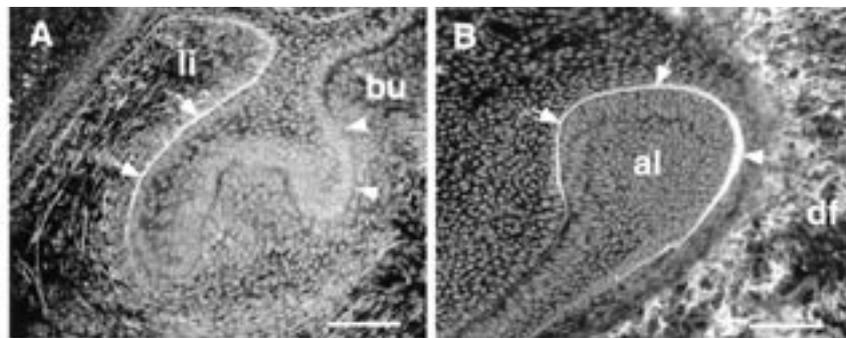


図 1. 白歯歯胚 E14 (A) 及び切歯 P2 (B) における TIMP-2 タンパクの局在

白歯 E14 において TIMP-2 タンパクは舌側(li)基底膜に局在するが(A, 矢印), 頬側(bu)基底膜には局在しない(A, 矢頭)。舌側間葉組織の細胞外基質にも TIMP-2 タンパクが認められる。切歯 P2 において、歯胚基底膜上では、アピカルループ(al)にのみ TIMP-2 タンパクが局在する(B, 矢印)。歯小囊(df)の細胞外基質にも TIMP-2 は豊富に観察される。スケールバー = 100  $\mu$  m