

学位申請論文

口腔粘膜上皮の角化制御における Collagen IV $\alpha 6$ の役割

小盛 大志

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 機能再生・再建科学専攻
インプラント再生補綴学分野

指導教授

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 インプラント再生補綴学分野
窪木 拓男

緒言

歯の長期予後を左右する重要な因子の1つに、健康な歯周組織が挙げられる。中でも、歯の周囲に存在する角化した歯肉組織は、口腔衛生の維持や感染予防に有利な環境を提供するだけでなく、過剰なメカニカルストレスから歯周組織を守り、長期的に安定した予後をもたらすために必要であると考えられている¹⁻⁵⁾。そのため、現在の歯科臨床においては、角化した歯肉組織が減少・不足した場合には、口蓋粘膜などから角化上皮を移植する遊離歯肉弁移植術が行われているが、移植片採取部位の術後疼痛や出血が患者の大きな苦痛となるうえ、組織の壊死・感染等の合併症発生率も高い⁶⁾。また、自己組織移植に依存しない再生療法は確立されておらず、より低侵襲、簡便かつ確実な治療法の開発が望まれているが、未だ口腔粘膜上皮の角化制御メカニズムは十分に理解されていない。

基底膜とは、上皮組織と間葉組織の間に形成される細胞外マトリックスの構造物であり、主として、IV型コラーゲン、ラミニン、パールカン、ニドジェンにより構成されている。基底膜は、上皮細胞の足場として働き、上皮組織の機

能や臓器の恒常性維持に関わっており，組織や臓器によってその構成分子が異なる⁷⁻¹⁰⁾。基底膜構成分子の一つであるIV型コラーゲンは，3つの α 鎖がtriple helix構造を呈し¹¹⁾，様々な組織に分布している。 α (IV)鎖は， $\alpha 1$ (IV)- $\alpha 6$ (IV)の6種類からなり，その組み合わせは， $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ ， $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ ， $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ の3つの分子しかなく， $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ はあらゆる基底膜に広く分布するのに対し， $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ と $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ は組織特異性を有し，例えば， $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ は糸球体やボーマン嚢，水晶体に存在する。そのため，*COL4A3*，*COL4A4*，および*COL4A5*の遺伝子疾患であるアルポート症候群は，腎機能障害や眼科的異常を呈することが知られている^{12, 13)}。このように，基底膜の構成に変化が生じれば，臓器の機能にも大きな変化が生じることから，角化粘膜上皮と非角化粘膜上皮は異なった基底膜構成分子により構成されており，これらの構成分子の違いが歯肉の角化に関与している可能性が推測される。

そこで本研究では，口腔粘膜上皮の角化制御メカニズムが不明である点から角化上皮である口蓋粘膜と非角化上皮である頬粘膜の基底膜におけるIV型コラーゲンの発現様式を免疫組織学的手法を用いて網羅的に解析し， $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ が角化上皮の基底膜に高発現していることを明らかにした。また，*Col4a6*遺伝子欠

損 (*Col4a6*-KO)マウスを用いた解析および *in vitro* における機能解析により,
 $\alpha 6$ 鎖を含む $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子が口腔粘膜上皮の角化において重要な制御因子の一つ
であることを明らかにしたので報告する。

材料ならびに方法

1. 動物実験モデル

すべての動物実験は岡山大学動物実験委員会の承認 (OKU-2016495, OKU-2017051)のもと実施した。C57BL6/J 妊娠マウスと 8 週齢雌性マウスは、日本クレア株式会社 (東京, 日本)より購入し使用した。また, 実験に使用した *Col4a6* 遺伝子欠損 (*Col4a6*-KO)マウスの作製手順を以下に簡単に示す。
Col4a6 遺伝子の Exon 2 と Intron 2 をネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲットベクターを作製し, ES 細胞へ電ポレーション法にて導入した。これらのベクターが導入された ES 細胞をサザンブロット法によりスクリーニングし, 相同組換え体の ES クローンを得た。これらの細胞からブラ

ストシスト注入法により作製したキメラマウスをライン化し、C57BL6 系統へのバッククロスを 10 回実施したマウスを用いて、本実験を行なった¹⁴⁾。

2. HE 染色および免疫組織化学染色

ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) には、4% paraformaldehyde (PFA) で固定し、ギ酸・クエン酸ナトリウム水溶液 (22.5% ギ酸, 10% クエン酸ナトリウム) によって室温で約 7 日間脱灰したマウスの試料から作製した厚さ 5 μ m のパラフィン切片を用いた。また、免疫組織化学染色には、川本法^{15, 16)}により作製した非脱灰凍結切片を用いた。すなわち、マウスから採取した試料を cryoembedding medium (SECTION-LAB Co. Ltd, 広島, 日本)を用いて凍結包埋した後、試料の表面に粘着性のフィルムを貼り付け、タングステンナイフで 5 μ m の厚さで切片を作製した。切片はアセトンにて 20 分固定し、免疫組織化学染色にて組織学的評価を行った。IV型コラーゲンの免疫組織化学染色は過去の報告に基づき実施した¹⁷⁾。すなわち、アセトンにて 20 分固定した切片を、1% BSA (Sigma, MO, USA)含有 5% Goat serum (Life technologies, Tokyo, Japan)で 1 時間ブロッキング後、一次抗体を 4 °Cで一晩反応させた。Anti

Cytokeratin 10 antibody (ab76318, 1 : 1000, Abcam, Cambridge, UK), および、岡山大学の佐渡先生から供与頂いた抗IV型コラーゲン抗体 ($\alpha 1$ [H11], $\alpha 2$ [H22], $\alpha 3$ [H31], $\alpha 4$ [RH42], $\alpha 5$ [H53], $\alpha 6$ [B66]) を一次抗体として用いた。IV型コラーゲンの抗体のうち、H22 は 50 倍に希釈し、その他はすべて 100 倍に希釈して使用した。さらに、H11, H22, H31, RH42 については、切片を予め 6M の尿素を含んだ 0.1M のグリシン溶液 (pH3.5) で 10 分間、B66 については 1 分間作用させた。なお、対照として一次抗体を作用させない切片を使用した。二次抗体として Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (Life technologies), Alexa Fluor 488 donkey anti-rat IgG (Life technologies) あるいは Alexa Fluor 647 anti-rabbit (Life technologies) を用い、室温にて 60 分間反応させた。核染色には DAPI を用い、染色した切片は蛍光顕微鏡 (キーエンス BZ-X710, 大阪, 日本) を用いて観察し、定量解析した。

3. 上皮細胞および培養法

上皮細胞は CELLnTEC advanced cell systems AG (Stauffacherstrasse, Bern, Switzerland) から購入したヒト口腔粘膜上皮細胞 (Human gingival

epithelial cells : hGECs)を使用した。培養には CnT-prime epithelial culture medium (CELLnTEC advanced cell systems AG)を用いて、37 °C、5 % CO₂ 気相下で培養した。細胞がサブコンフルエントに達した時点で Accutase® (Advanced Cell Technology and Engineering Ltd, Tokyo, Japan) を作用させ細胞を剥離後、通法に従い継代し、4~6 継代細胞を下記の実験に用いた。

hGECs の分化誘導には Thin Cert 細胞培養インサート (Greiner Bio One, Kremsmünster, Austria)を用い、附属のプロトコルに従い実施した。すなわち、上部 chamber である 12 well plate 用 Thin Cert 細胞培養インサートに 5×10^5 個/well で hGECs を播種し、CnT-Prime 3D barrier medium (CELLnTEC advanced cell systems AG, Stauffacherstrasse: 3D-medium)にて1日間培養した。hGECs が細胞培養インサートに接着したのを確認した後、上下 chamber の培地を吸引後、上部 chamber には培地を加えず、下部 chamber に 4mL の 3D-medium を加え、7 日間培養した。

遺伝子抑制実験には、Stealth™ RNAi (Life technologies, Tokyo, Japan) を使用した。つまり、ヒト Col4a6 Stealth™ siRNA (siCol4a6)を Lipofectamine RNAi MAX (Life technologies)を用い、附属のプロトコルに従い、hGECs に遺

伝子導入した。遺伝子導入した hGECs は 12well plate 用 Thin Cert 細胞培養インサートに 2.5×10^6 個/well で播種した。培養 1 日後に上下チャンバーの培地を吸引し、下部チャンバーにのみ、4 mL の 3D-medium を加えた。siCol4a6 導入後 72 時間に RNA を、7 日後にタンパク質を回収し、下記の実験に用いた。対照として、Stealth™ RNAi Negative Control (Life technologies) を遺伝子導入した hGECs を同様に培養した。

4. 定量 RT-PCR

培養細胞からの total RNA の抽出、精製には、PureLink® RNA Mini Kit (Life technologies) を用いた。採取した RNA サンプルは iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。定量性 RT-PCR は CFX96 (Bio-Rad Laboratories) を用いて、増幅反応には Kappa™ SYBR® FAST qPCR Kits (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA, USA) を使用し、95 °C 10 秒、65 °C 30 秒のステップを 40 サイクル繰り返した。内部標準遺伝子としてとして 29s リボソーム RNA (s29) を使用した。解析対象遺伝子およびプライマーの塩基配列を表 1 に示す。

5. Western blotting

Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Indianapolis, IN, USA)含有 M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent; Thermo, Waltham, Massachusetts, USA)に hGECs を回収し, 超音波破碎を行い, タンパク質を抽出した。総タンパク質量を定量後, 10 μg のサンプルを 2.5% β -メルカプトエタノール含有 SDS サンプルバッファーと混合し, 5 分間煮沸し還元状態にした後に, SDS-PAGE で分離した。その後, ポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF 膜 : GE healthcare, Buckinghamshire, UK)に転写した。転写した PVDF 膜を 1% skim milk にて室温で 1 時間ブロッキングした。その後, Keratin10 (KRT10)に対する 1 次抗体として, Anti-Cytokeratin 10 antibody (ab 76318, 1: 2000; Abcam, Cambridge, UK)と Anti β -actin antibody (1:2000; Sigma)を 4°Cにて 12 時間反応させた。

次いで, 2 次抗体として goat anti-rabbit IgG-HRP (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)もしくは goat anti-mouse IgG-HRP (1:2000; Santa Cruz Biotechnology)を用い室温で 1 時間作用させた。シグナルの検出には Forte western HRP Substrate

(Millipore)を使用し, Image Quant LAS 4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan)

を用いて観察した。

6. 統計解析

各データの統計学的有意性は, 各条件に対して試料の数値を測定し, 一元配置分散分析と多重比較検定, 対応のない t 検定を用いて検討した。

結果

1. 口蓋粘膜と頬粘膜における組織学的解析

初めに, マウス口腔内における口蓋粘膜と頬粘膜の相違を組織学的に検討した。図 1 に 8 週齢マウス頭部前頭断面で観察された, HE 染色および免疫組織化学染色の結果を示す。HE 染色では, マウス口蓋粘膜および頬粘膜はともに類似した組織像を示した (図 1A-C)。また, 上皮角化マーカーの一つ^{18,19)}である KRT10 の免疫組織化学染色の結果, その発現は口蓋粘膜と遊離歯肉に観察され

たが、頬粘膜には観察されなかった (図 1D, E)。つまり、口蓋粘膜は KRT10 陽性の角化上皮であり、頬粘膜は KRT10 陰性の非角化上皮であることが確認された。

2. 角化歯肉と非角化歯肉の基底膜における網羅的なIV型コラーゲンの発現解析

次に、口蓋粘膜の角化上皮と頬粘膜の非角化上皮の基底膜構成分子の相違を明らかにするため、8週齢マウスの前頭断の切片を用いて、免疫組織化学染色法にて解析を行った。その結果、角化上皮と非角化上皮ともに $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 2$ 鎖の発現が認められ、両上皮間でそれらの発現強度には差が認められなかった (図 2A-D)。また、どちらの組織にも $\alpha 3$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖の発現は確認されなかった (図 2E-H)。一方、角化上皮の基底膜には非角化上皮と比較して $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖の発現が高いことが確認された (図 2I-L)。また、一次抗体を反応させなかった対照群では、シグナルは認められなかった。

3. 発生期におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖と KRT10 の発現解析

マウス口腔において、胎生 12.5 日に両側の口蓋突起が形成され、胎生 14.5 日でそれらは癒合を開始し、胎生 15.5 日には閉鎖して口蓋が形成されることが知られている²⁰⁾。そこで、口蓋粘膜の発生期における $\alpha 6$ 鎖の発現と歯肉角化の時系列を検討するため、マウス胎生 12.5 日から 18.5 日の組織切片を作製し、HE 染色及び免疫組織化学染色を行った。その結果、胎生 16.5 日に口蓋が閉鎖している像が観察されたが (図 3A-D)、角化マーカーである KRT 10 は口蓋閉鎖後の胎生 18.5 日以降でその発現が確認された。一方、 $\alpha 6$ 鎖は口蓋の閉鎖より早く、胎生 14.5 日に発現を認め、発生とともに、その発現範囲部位が口蓋において拡大していく事が確認された (図 3E-L)。つまり、口蓋粘膜の発生において、 $\alpha 6$ 鎖の発現後に、角化マーカーである KRT10 が発現することが確認された。また、一次抗体を反応させなかった対照群では、シグナルは認められなかった。

4. *In vivo* における IV 型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の機能解析

次に、*Col4a6*-KO マウスを使用し、*Col4a6* の口腔粘膜上皮の角化に与える影響を検討した。初めに、生後 0 日の野生型 (WT) マウスおよび *Col4a6*-KO マウスの KRT10 の発現を免疫組織化学染色にて比較検討した。その結果、口蓋粘膜

における KRT10 の発現は WT マウスと比較し、*Col4a6*-KO マウスにおいて有意に低下していた (図 4A,C)。また、興味深いことに、WT マウスと比較し、*Col4a6*-KO マウスの上皮組織の面積が有意に減少していた (図 4B)。一方、28 週齢のマウスにおいて、KRT10 の発現は *Col4a6*-KO マウスにおいて、有意に低下していたが、上皮組織の面積に差は認めなかった (図 4D-F)。また、一次抗体を反応させなかった、対照群ではシグナルは認めなかった。

5. *In vitro* における IV 型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の機能解析

最後に、hGECs の 3 次元培養法にて $\alpha 6$ 鎖が上皮細胞の角化に与える影響を検討した。初めに、hGECs を 3 次元培養し、*COL4A6* および角化マーカーの遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法を用いて解析した^{18,19)}。その結果、*COL4A6* の遺伝子発現は培養開始 3 日目に約 2.6 倍、7 日目に 4.7 倍の発現上昇を認めた (図 5A)。一方、*KRT1* および *KRT10* は、培養開始 3 日目まで発現変動を認めず、培養 7 日目において有意な遺伝子発現の上昇を認めた (図 5B,C)。

そこで *COL4A6* が *KRT10* の発現を制御している可能性を検討するために、siRNA システムを用いて *COL4A6* の発現抑制実験を実施した。その結果、

siRNA を遺伝子導入した hGECs において *COL4A6* の発現は約 80% 抑制され、それに伴い、*KRT1* と *KRT10* の発現も有意に低下した (図 5D-F)。また、*KRT10* のタンパク質の発現も低下していることが確認された(図 5G)。

考察

口腔粘膜上皮の角化・非角化の制御メカニズムは未だ不明である。本研究では、基底膜が上皮組織の分化や恒常性維持に関わっていることから²¹⁾、基底膜の主要構成分子の一つである IV 型コラーゲンに着目し、口蓋粘膜 (角化上皮) と、頬粘膜 (非角化上皮) を用いて、解析を行った。その結果、角化上皮の基底膜には、非角化上皮の基底膜と比較し、IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖と $\alpha 6$ 鎖が高発現していることが明らかとなった (図 2)。また、WT マウスと比較し、*Col4a6*-KO マウスの角化上皮において、角化マーカーの一つである *KRT10* のタンパク質の発現量が低下していること、また、*Col4a6* の遺伝子発現を siRNA を用いて抑制すると、口蓋粘膜上皮細胞の角化が抑制されたことから、 $\alpha 6$ 鎖を含む唯一の

IV型コラーゲンである $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子が口腔粘膜上皮の角化制御に関わっている基底膜分子の一つであることが明らかとなった。

IV型コラーゲンは6種類の α 鎖を持ち、 $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ 、 $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ 、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ の三量体を形成し、*COL4A3*や*COL4A4*、*COL4A5*遺伝子に変異が生じると糸球体腎炎や感音性難聴を伴うアルポート症候群を発症することが知られている^{11-13, 22, 23})。また、これらの遺伝子の一つが欠損、もしくは変異が入ると他の α 鎖が形成されないことが報告されている¹¹)。*Col4a6-KO*マウスにおいて、 $\alpha 6$ 鎖のみならず、 $\alpha 5$ 鎖も消失することを免疫組織化学染色にて確認しており、本KOマウスにおける $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子の消失により口蓋粘膜の角化が抑制されるとみなすことができる。したがって、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子が口腔粘膜の角化に重要な役割を担っている可能性が示唆される。

一方、生体内には多くの組織幹細胞が存在し、それらには特有のニッチ環境が備わっている。皮膚や粘膜の上皮組織内にも上皮幹細胞が存在し、それらが上皮組織の発生や恒常性維持に関わっていることが報告されてきた²¹)。この上皮幹細胞の幹細胞性を維持するのに重要な役割を担っているのが基底膜であると考えられており、口腔粘膜上皮幹細胞マーカーを発現した細胞は、IV型コラ

ーゲンとの接着性が高いことが報告されている^{24,27)}。我々の結果でも、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子が高発現している口蓋粘膜において、出生直後の *Col4a6-KO* マウスでは、上皮組織の厚みが減少し、結果には示していないがヒト口腔粘膜細胞において *COL4A6* の発現を抑制することで細胞分裂のマーカー (cyclinD) の発現が減少することを確認している。以上から、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子の減少により、上皮細胞の増殖が抑制されたと考えられ、基底膜に存在する $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子が角化粘膜上皮の上皮幹細胞の幹細胞性維持に関わっている可能性が強く推測される。今後、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子と口腔粘膜上皮幹細胞ニッチの関係を詳細に検討していく予定である。

今回の研究では、基底膜の構成成分の一つであるIV型コラーゲンに着目し、 $\alpha 6$ 鎖が口腔粘膜上皮の角化を制御する重要な因子の一つであることを明らかにした。しかし、角化にはIV型コラーゲンのみならずラミニンをはじめとしたその他の基底膜分子やサイトカインが関与している可能性が考えられ、口腔粘膜上皮の角化・非角化の制御メカニズムの全貌解明には、さらに様々な角度からのアプローチが必要と思われる。しかし、これらの全貌が明らかとなれば、より低侵襲で確実な角化歯肉誘導法の開発につながると考える。

結論

1. 角化上皮であるマウス口蓋粘膜の基底膜では、非角化上皮である頬粘膜の基底膜と比較し、 $\alpha5/\alpha5/\alpha6(IV)$ が高発現していることが確認された。
2. マウス口蓋粘膜の発生過程において、 $\alpha6(IV)$ 鎖の発現後に角化マーカである KRT10 の発現が亢進することが確認された。
3. 遺伝子欠損マウスおよび siRNA を用いた機能阻害実験の結果から、 $\alpha6$ 鎖を含む $\alpha5/\alpha5/\alpha6$ 分子が口腔角化粘膜上皮の形成や角化の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり，御懇切なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科のインプラント再生補綴学分野 窪木拓男教授，ならびに分子医化学分野 大橋俊孝教授に深甚なる感謝の意を表します。また，研究を遂行するに当たり，終始御指導，御鞭撻を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科分子医科学分野 大野充昭助教に謹んで感謝の意を表します。最後に，本研究を進める際に，様々な御配慮，御援助，御助言いただきました，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科のインプラント再生補綴学分野，ならびに分子医化学分野の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Groeger, S. E., Meyle, J.: Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol 2000*, **69**, 46-67, 2015.
- 2) Lang, N. P., Loe, H.: The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health. *J Periodontol*, **43**, 623-627, 1972.

- 3) Miyasato, M., Crigger, M., Egelberg, J.: Gingival condition in areas of minimal and appreciable width of keratinized gingiva. *J Clin Periodontol*, **4**, 200-209, 1977.
- 4) Chung, D. M., Oh, T. J., Shotwell, J. L., Misch, C. E., Wang, H. L.: Significance of keratinized mucosa in maintenance of dental implants with different surfaces. *J Periodontol*, **77**, 1410-1420, 2006.
- 5) Schrott, A. R., Jimenez, M., Hwang, J. W., Fiorellini, J., Weber, H. P.: Five-year evaluation of the influence of keratinized mucosa on peri-implant soft-tissue health and stability around implants supporting full-arch mandibular fixed prostheses. *Clin Oral Implants Res*, **20**, 1170-1177, 2009.
- 6) Egli, U., Vollmer, W. H., Rateitschak, K. H.: Follow-up studies of free gingival grafts. *J Clin Periodontol*, **2**, 98-104, 1975.
- 7) Yurchenco, P. D.: Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**, 2011.
- 8) Hynes, R. O.: The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, **326**, 1216-1219, 2009.

- 9) Poschl, E., Ursula, S. S., Bent, B., Kenji, S., Yoshifumi, N., Ulrike, M.:
Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for
initiation of its assembly during early development. *Development*, **131**,
1619-1628, 2004.
- 10) Schwarzbauer, J.: Basement membranes: Putting up the barriers. *Curr
Biol*, **9**, R242-244, 1999.
- 11) Sado, Y., Kagawa, M., Naito, I., Ueki, Y., Seki, T., Momota, R., Oohashi, T.,
Ninomiya, Y.: Organization and expression of basement membrane collagen
IV genes and their roles in human disorders. *J Biochem*, **123**,767-776, 1998.
- 12) Alavi, M. V., Marcel, V. A., Mao, M., Bradley, T. P., Manana, K., Jacque, L.,
Richard, T. L., Simon W. M. J., Douglas B. G.: Col4a1 mutations cause
progressive retinal neovascular defects and retinopathy. *Sci Rep*, **6**, 18602,
2016.
- 13) Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., Hudson, B. G.: Mammalian collagen IV.
Microsc Res Tech, **71**, 357-370, 2008.

- 14) Fox, M. A., Sanes, J. R., Borza D. B., Eswarakumar, V. P., Fässler, R., Hudson, B. G., John, S. W., Ninomiya, Y., Pedchenko, V., Pfaff, S. L., Rheault, M. N., Sado, Y., Segal, Y., Werle, M. J., Umemori, H.: Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell*, **129**, 179-193, 2007.
- 15) Kawamoto, T., Kawamoto, K.: Preparation of thin frozen sections from nonfixed and undecalcified hard tissues using Kawamoto's film method (2012). *Methods Mol Biol*, **1130**, 149-164, 2014.
- 16) Inagawa, K., Oohashi, T., Nishida, K., Minaguchi, J., Tsubakishita, T., Yaykasli, K. O., Ohtsuka, A., Ozaki, T., Moriguchi, T., Ninomiya, Y.: Optical imaging of mouse articular cartilage using the glycosaminoglycans binding property of fluorescent-labeled octaarginine. *Osteoarthritis Cartilage*, **17**, 1209-1218, 2009.
- 17) Murata, T., Katayama, K., Oohashi, T., Jahnukainen, T., Yonezawa, T., Sado, Y., Ishikawa, E., Nomura, S., Tryggvason, K., Ito, M.: COL4A6 is

- dispensable for autosomal recessive Alport syndrome. *Scientific Reports*,**6**, 29450, 2016.
- 18) Wallace, L., Roberts, L., Reichelt, J.: Deletion of K1/K10 does not impair epidermal stratification but affects desmosomal structure and nuclear integrity. *journal of cell science*,**125**,1750-1758,2012.
- 19) Pearson, H B., McGlinn, E., Pheesse, T J., Schlüter, H., Srikumar, K, Gödde, N J., Woelwer, C B., Ryan, A., Phillips, W A., Ernst, M., Kaur, P., Humbert, P.: The polarity protein Scrib mediates epidermal development and exerts a tumor suppressive function during skin carcinogenesis. *Molecular Cancer*, **14**, 169, 2015.
- 20) Bush, J. O., Jiang, R.: Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development*, **139**, 231-243, 2012.
- 21) Calenic, B., Greabu, M., Caruntu, C., Tanase, C., Battino, M.: Oral keratinocyte stem/progenitor cells: specific markers, molecular signaling pathways and potential uses. *Periodontol 2000*, **69**, 68-82, 2015.

- 22) Cosgrove, D., Meehan, D. T., Grunkemeyer, J. A., Kornak, J. M., Sayers, R., Hunter, W. J., Samuelson, G. C.: Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev*, **10**, 2981-2992, 1996.
- 23) Miner, J. H., Sanes, J. R.: Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *J Cell Biol*, **135**, 1403-1413, 1996.
- 24) Tulla, M., Pentikäinen, O. T., Viitasalo, T., Käpylä, J., Impola, U., Nykvist, P., Nissinen, L., Johnson, M. S., Heino, J.: Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J Biol Chem*, **276**, 48206-48212, 2001.
- 25) Kern, A., Eble, J., Golbik, R., Kuhn, K.: Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1. *Eur J Biochem*, **215**, 151-159, 1993.
- 26) Gardner, H., Kreidberg, J., Koteliansky, V., Jaenisch, R.: Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine

development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev Biol*, **175**, 301-313, 1996.

27) Yonezawa, T., Hattori, S., Inagaki, J., Kurosaki, M., Takigawa, T., Hirohata, S., Miyoshi, T., Ninomiya, Y.: Type IV collagen induces expression of thrombospondin-1 that is mediated by integrin alpha1beta1 in astrocytes. *Glia*, **58**, 755-767, 2010.

図の解説文

図 1 口蓋粘膜と頬粘膜の組織学的解析

8 週齢マウスの前頭断の脱灰標本からパラフィン切片を作製し HE 染色を, 非脱灰標本から凍結切片を作製し, 免疫組織化学染色を行った。(A-C)は HE 染色像, (B, C)は, それぞれ口蓋粘膜と頬粘膜の拡大像を示す。(D,E)は口蓋粘膜と頬粘膜の keratin 10 (KRT10)に対する免疫組織化学染色像を示す。(Epi ; 上皮組織, M ; 間葉組織, B ; 骨, T ; 歯牙, To ; 舌) 実験は 3 回繰り返し同様の

結果が得られたため、代表的な結果を示す。

図2 角化上皮と非角化上皮の基底膜におけるIV型コラーゲンの発現解析

マウス口蓋粘膜のIV型コラーゲンの免疫組織化学染色像を示す。(A, B)は $\alpha 1(\text{IV})$, (C, D)は $\alpha 2(\text{IV})$, (E, F)は $\alpha 3(\text{IV})$, (G, H)は $\alpha 4(\text{IV})$, (I, J)は $\alpha 5(\text{IV})$, (K, L)は $\alpha 6(\text{IV})$ に対する免疫組織化学染色の結果であり,それぞれ上段が角化上皮(A, C, E, G, I, K),下段が非角化上皮(B, D, F, H, J, L)を示す。(点線;基底膜相当部,矢印;positive signal, Epi;上皮組織, M;間葉組織)。実験は3回繰り返し同様の結果が得られたため、代表的な結果を示す。

図3 発生期におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖とkeratin 10 (KRT10)の発現解析

胎生12.5日(A, E),胎生14.5日(B, F),胎生16.5日(C, G),胎生18.5日(D, H)のマウス頭部前頭断のHE染色像(A-D)および $\alpha 6(\text{IV})$ とKRT10に対する免疫組織化学染色の結果を示す(E-H)。(赤; $\alpha 6(\text{IV})$,緑;KRT10)。実験は3回繰り返し同様の結果が得られたため、代表的な結果を示す。

図 4 *In vivo* におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の機能解析

生後 0 日齢 (Newborn mice) (A) と 28 週齢 (Aged mice) (D)における WT マウスと KO マウスの Keratin 10 (KRT10)に対する免疫組織化学染色像の結果を示す (Epi ; 上皮組織, M ; 間葉組織)。また, WT マウスと KO マウスの上皮組織の面積および上皮組織内の KRT10 陽性率を算出し, 上皮組織の面積 (B, E)および KRT10 の陽性率の平均値 \pm 標準偏差 (C, F)をグラフに示す (対応のない t 検定 : * $p < 0.05$)。面積は基底膜から, 上皮最外層までを上皮組織として算出した。実験は 3 回繰り返し同様の結果が得られたため, 代表的な結果を示す。

図 5 3次元培養におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の機能解析

(A-C) hGECsを cell culture insertsを用いて7日間3次元培養し, 0, 3, 7日目にtotal RNAを回収し, *COL4A6* (A), *KRT1* (B), *KRT10* (C)の遺伝子発現を定量RT-PCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現量の平均値 \pm 標準偏差をグラフに示す (ANOVA, 多重比較検定 : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。 (D-F) siRNAを用い*COL4a6*の遺伝子発現を抑制したhGECsをThin Cert細胞培養インサー

トを用いて3次元培養し, 3日後にtotal RNAを回収し, *COL4A6* (D), *KRT1* (E), *KRT10* (F) の遺伝子発現を定量RT-PCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現量の平均値±標準偏差をグラフに示す (対応のないt検定, * $p<0.05$, *** $p<0.001$)。 (G) 7日間培養した細胞からタンパク質を回収し, *KRT10*の発現量をWestern blotting法により解析した。実験は3回繰り返し同様の結果が得られたため, その代表的な結果を示す。

図6 *Col4a6*-KO マウスの基底膜におけるIV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖の発現

28週齢マウスにおけるWTマウスとKOマウスの $\alpha 5$ (IV)および $\alpha 6$ (IV)に対する免疫組織化学染色像を示す。(Epi ; 上皮組織, M ; 間葉組織)

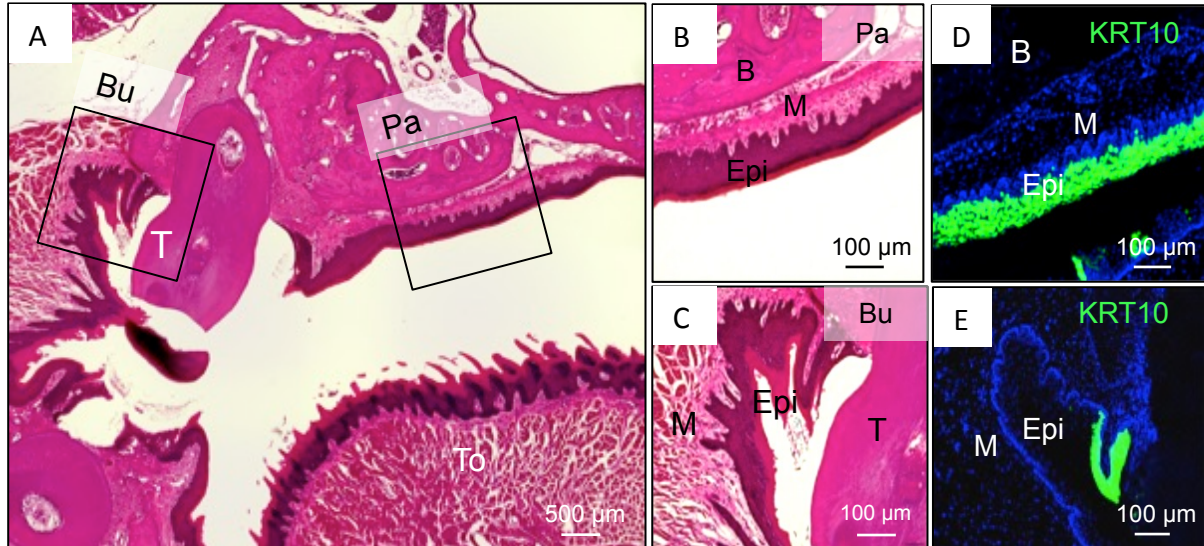


図1 口蓋粘膜と頬粘膜の組織学的解析

8週齢マウスの前頭断の脱灰標本からパラフィン切片を作製しHE染色を, 非脱灰標本から凍結切片を作製し, 免疫組織化学染色を行った。(A-C)はHE染色像, (B, C)は, それぞれ口蓋粘膜と頬粘膜の拡大像を示す。(D,E)は口蓋粘膜と頬粘膜のKRT10に対する免疫組織化学染色像を示す。

(Epi; 上皮組織, M; 間葉組織, B; 骨, T; 歯牙, To; 舌, KRT; Keratin10)

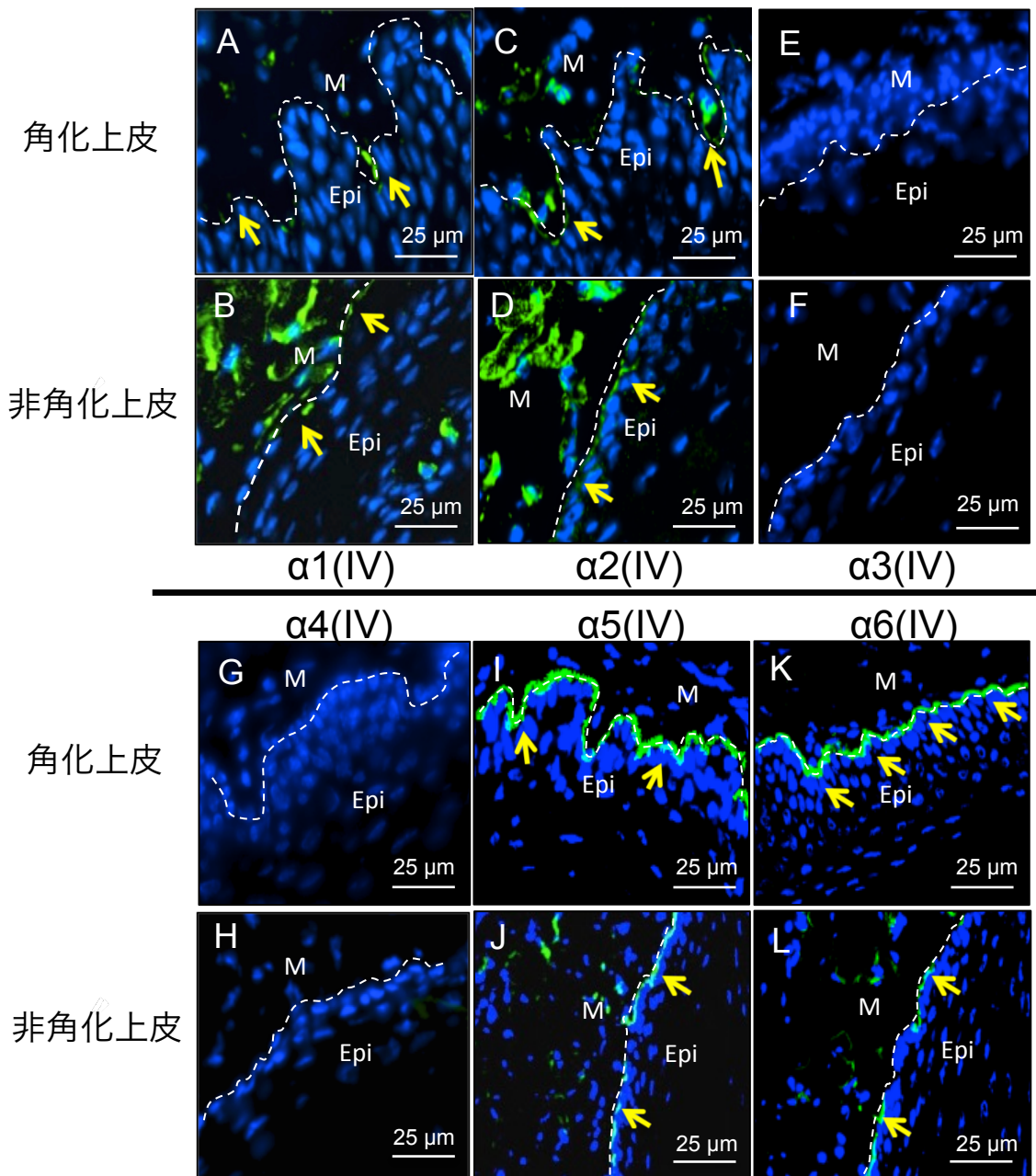


図2 角化上皮と非角化上皮の基底膜におけるIV型コラーゲンの発現解析

マウス口蓋粘膜のIV型コラーゲンの免疫組織化学染色像を示す。(A, B)は $\alpha 1(IV)$, (C, D)は $\alpha 2(IV)$, (E, F)は $\alpha 3(IV)$, (G, H)は $\alpha 4(IV)$, (I, J)は $\alpha 5(IV)$, (K, L)は $\alpha 6(IV)$ に対する免疫組織化学染色の結果であり, それぞれ上段が角化上皮 (A, C, E, G, I, K), 下段が非角化上皮 (B, D, F, H, J, L)を示す。

(点線;基底膜相当部, 矢印;positive signal, Epi;上皮組織, M;間葉組織)。

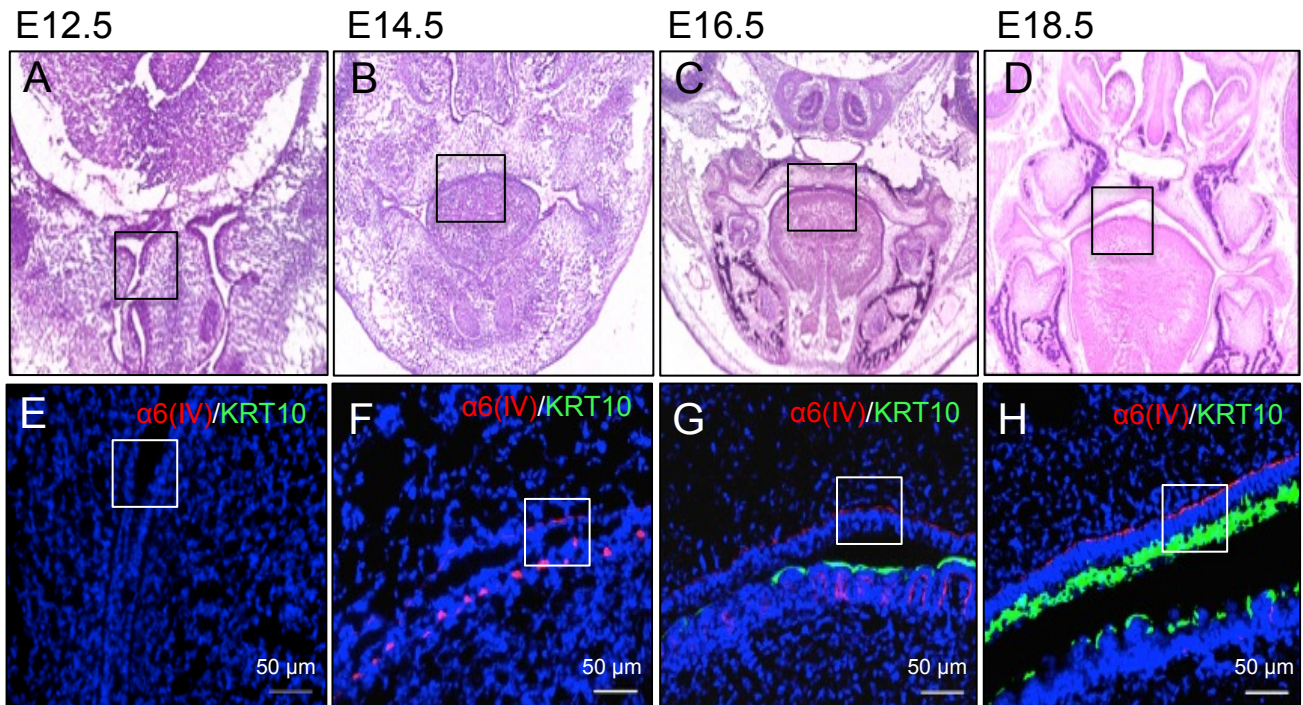


図3 発生期におけるIV型コラーゲン α 6鎖とKeratin 10の発現解析

胎生12.5日 (A, E), 胎生14.5日 (B, F), 胎生16.5日 (C, G), 胎生18.5日 (D, H)のマウス頭部前頭断のHE染色像 (A-D)および α 6鎖とKRT10に対する免疫組織化学染色の結果を示す (E-H)。(赤; α 6鎖, 緑; KRT10)。

(α 6(IV); IV型コラーゲン α 6鎖, KRT10; Keratin10)

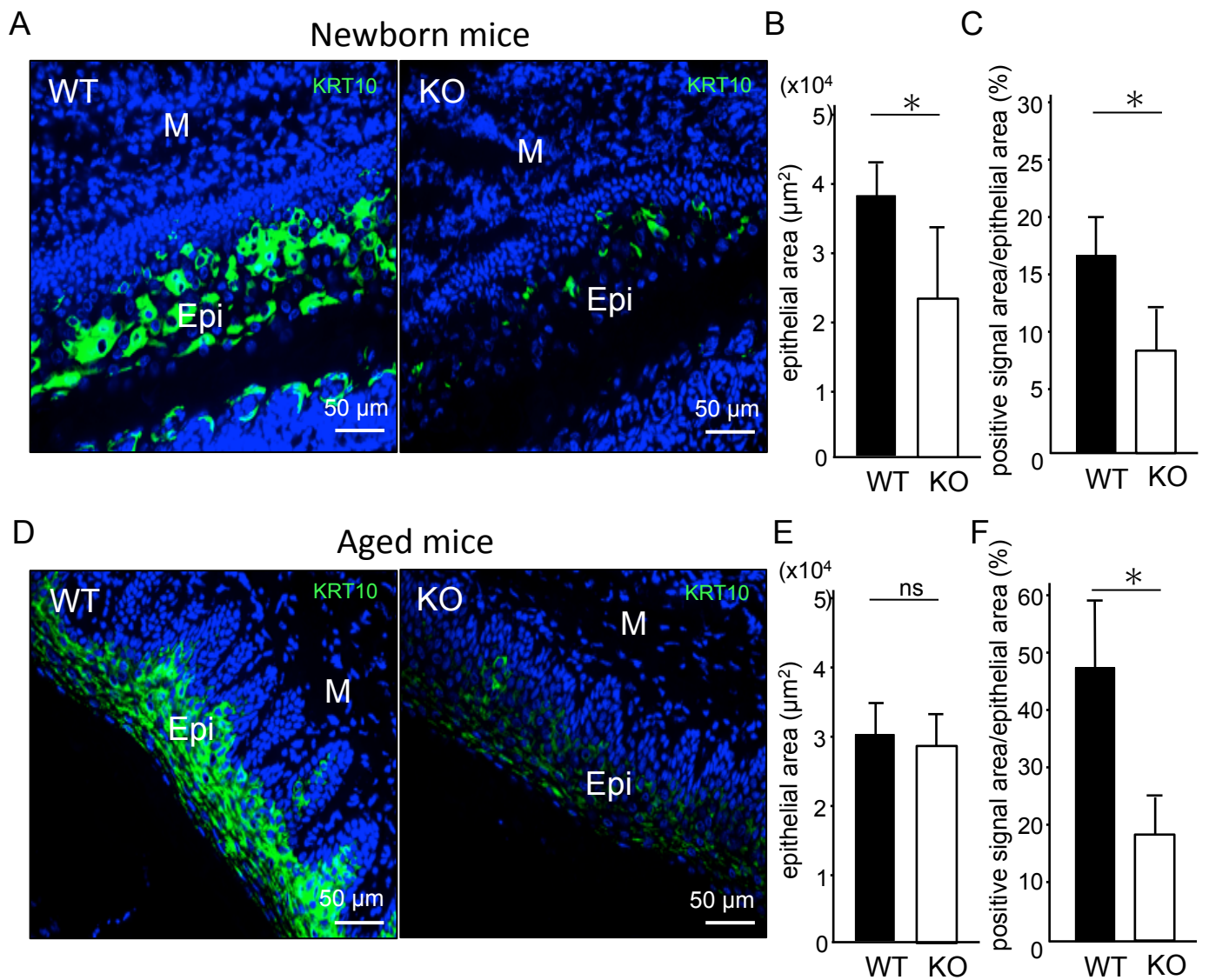


図4 *in vivo*におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の機能解析

生後0日におけるWTマウスとKOマウスのKRT10に対する免疫組織化学染色像(A)と28週齢の免疫組織化学染色の結果を示す(D)。

(Epi; 上皮組織, M; 間葉組織)。

また, WTマウスとKOマウスの上皮組織の面積および上皮組織内のKRT10陽性率を算出し, 上皮組織の面積 (B, F)およびKRT10の陽性率の平均値±標準偏差 (C, F)をグラフに示す(対応のないt検定: * $p < 0.05$)。

面積は基底膜から, 上皮最外層までを上皮組織として算出した。

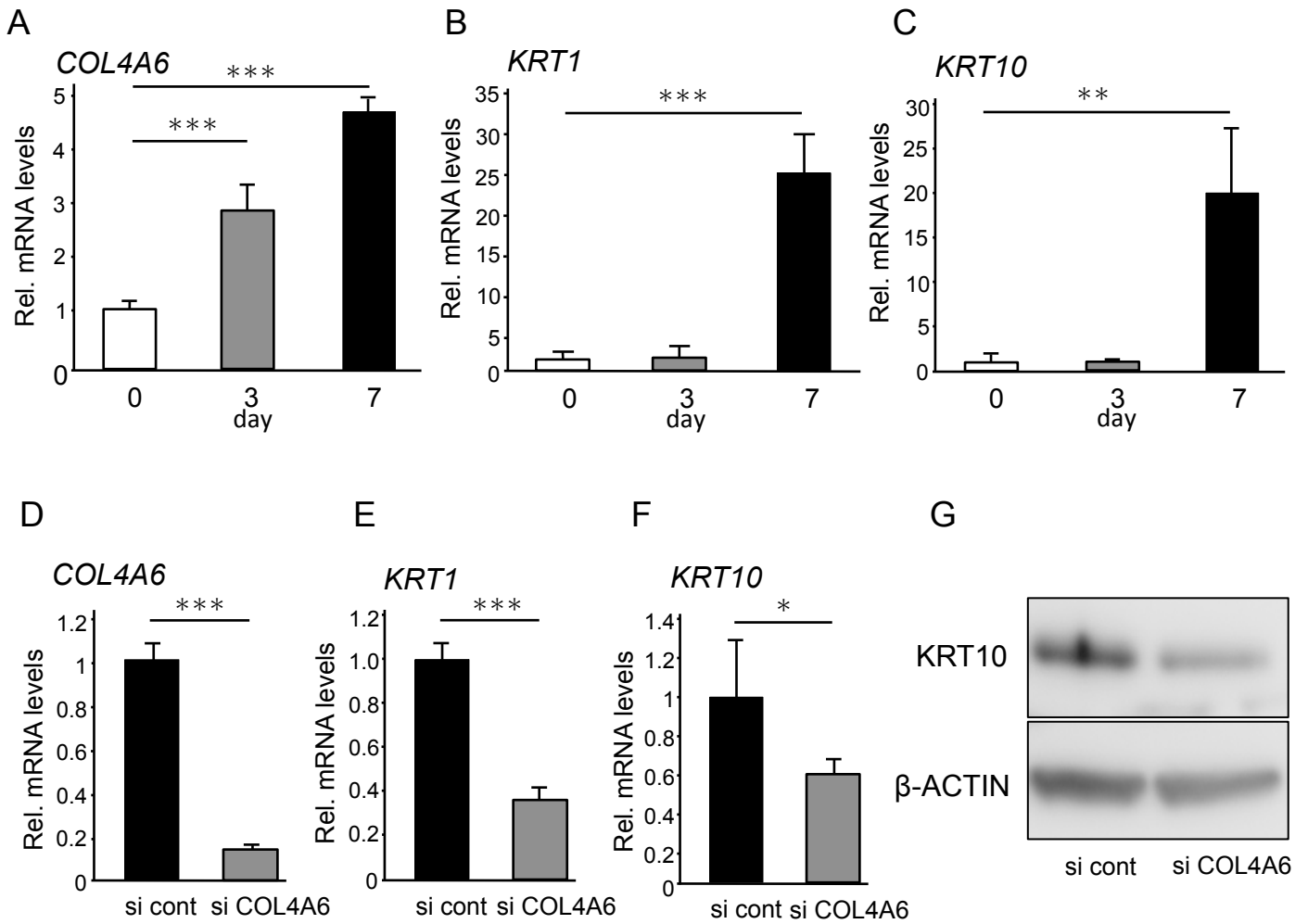


図5 3次元培養におけるIV型コラーゲン α 6鎖の機能解析

(A-C) hGECsをcell culture insertsを用いて7日間3次元培養し、0, 3, 7日目にtotal RNAを回収し、*COL4A6* (A), *KRT1* (B), *KRT10* (C)の遺伝子発現を定量性RT-PCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現量の平均値 \pm 標準偏差をグラフに示す (ANOVA, 多重比較検定: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。 (D-F) siRNAを用い*COL4a6*の遺伝子発現を抑制したhGECsをcell culture insertsを用いて3次元培養し、3日後にtotal RNAを回収し、*COL4A6* (D), *KRT1* (E), *KRT10* (F)の遺伝子発現を定量性RT-PCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現量の平均値 \pm 標準偏差をグラフに示す (対応のないt検定, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)。 (G) 7日間培養した細胞からタンパク質を回収し、KRT10の発現量をWestern blotting法により解析した。

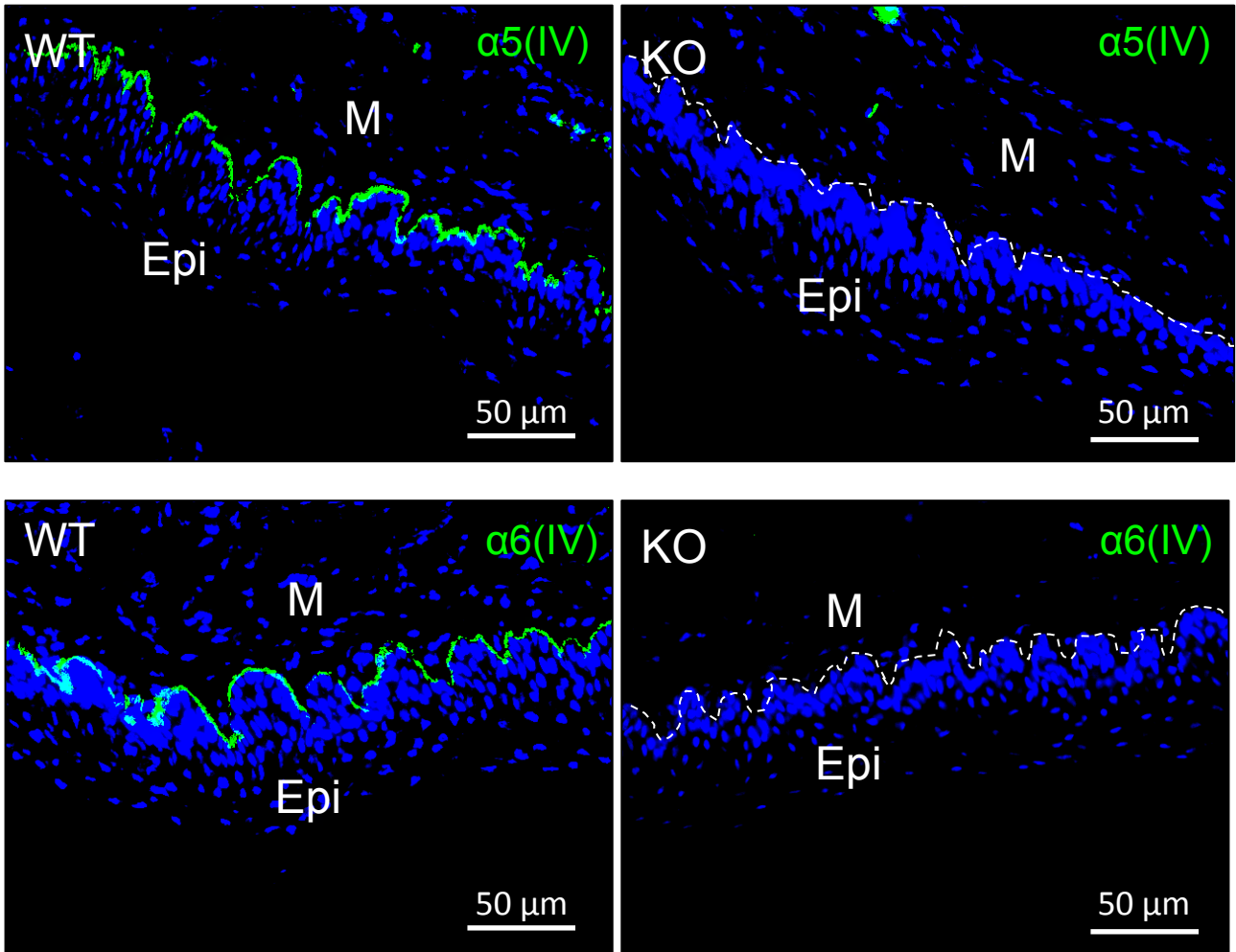


図6 *Col4a6*-KO マウスの基底膜におけるIV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖の発現
 28週齢マウスにおけるWTマウスとKOマウスの $\alpha 5(IV)$ および $\alpha 6(IV)$ に対する免疫組織化学染色像を示す。
 (Epi;上皮組織, M;間葉組織)。

表1 RT-PCRに用いたプライマーの塩基配列

Target gene	Type	GeneBank registration number	Primer set
S29	human	BC032813	5'- TCTCGCTCTTGTCGTGTCTGTTC -3' (S)
			5'- ACACTGGCGGCACATATTGAGG -3'(AS)
<i>KRT1</i>	human	BC063697	5'-CTTACTCTACCTTGCTCCTACT -3' (S)
			5'-AAATCTCCCACCACCTCC -3' (AS)
<i>KRT10</i>	human	NM_000421	5'- ACACCGCACAGAACCACCACTC -3' (S)
			5'- GGCAGGCACAGGTCTTGATGAAC -3' (AS)
COL4A6	human	NM_001847	5'-TGATTTGGATGATTGTGTGACT -3' (S)
			5'- GACTGATTAGGCGATTAGGAAGA -3' (AS)

S: sense, AS:antisense

KRT1: Keratin1

KRT10: Keratin10

COL4A6:IV型コラーゲンα6