

学 位 論 文

抜歯後組織修復における金属結合タンパク質
メタロチオネイン-1/-2 の関与

西田 優花

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員：十川 紀夫 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

The involvement of metal-binding protein,
metallothionein-1/-2 in the tissue repair
after tooth extraction

Yuka Nishida

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Professor Norio Sogawa)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要 旨

メタロチオネイン(MT)は、多様な刺激により誘導される低分子量の金属結合タンパク質である。分子内に豊富に存在するチオール基を介した作用により、亜鉛や銅などの必須微量元素恒常性維持や抗酸化作用を示すことが報告されているが、皮膚の創傷治癒時にも誘導されることから、細胞増殖や創傷治癒への関与も示唆されている。しかし、MT が創傷治癒に関わる機序の詳細は未だ明確になっていない。

ところで、歯科診療において抜歯は通常処置の 1 つであるが、抜歯窩では上皮再生が進行しており、皮膚創傷治癒時と同様、抜歯窩での組織修復にも MT の関与が想定される。しかし、MT と抜歯後組織修復との関連については未だ報告がない。したがって、本研究では、MT-1/-2 欠損マウスと野生型マウスを用い、抜歯後組織修復における MT-1/-2 の関与について検討した。

まず、野生型マウスを用いて抜歯後上皮再生時の MT-1/-2 局在を検討した。抜歯は雄性、28 日齢マウスの上顎右側第一臼歯で行い、0, 3, 5, 7 日後に上顎骨を採取した。その後、上顎骨の脱灰パラフィン包埋切片を作成し、組織学的評価 (HE 染色, 組織化学染色 [抗 proliferation marker protein Ki-67 (Ki-67) 抗体, 抗 MT-1/-2 抗体]) を行なった。

次いで、野生型および MT-1/-2 欠損マウスを用いて、同様の抜歯処置および上顎骨採取を行い、抜歯後の上皮再生と骨新生における差異を検討した。上皮再生は創傷面積で評価し、抜歯部位の実体顕微鏡画像を NIH ImageJ で測定した。

また、骨新生は、抜歯窩歯槽部(近・遠心頬側根, 口蓋根)の骨密度(新生骨体積/抜歯窩歯槽部体積, %)で評価し、 μ CT 画像を解析することにより算出した。

さらに、MT-1/-2 欠損マウスにおいて抜歯前日より 4 日間、 α -トコフェロールを腹腔内投与し、抜歯 3 日後の抜歯後上皮再生に対する影響を検討した。

その結果，再生上皮において，MT-1/-2 は Ki-67 と比較し，多種の細胞に発現していたが，共に基底細胞に発現し，その発現領域は近似していることを認めた．

また，創傷面積は，両系統マウス共に抜歯後経時的に減少したが，抜歯 3，7 日後における MT-1/-2 欠損マウスの創傷面積は，野生型マウスに比べて有意に高値であった．なお，MT-1/-2 欠損マウスにおける抜歯 3 日後の α -トコフェロール投与群の創傷面積は，対照群と比較し有意に低値であった．

一方，抜歯窩歯槽部の骨密度は経時的に増加したが，抜歯 3，5，7 日後において MT-1/-2 欠損マウスで骨密度が低値となる傾向があったものの，野生型マウスとの間に有意な差は認められなかった．

以上の結果より，MT-1/-2 欠損マウスでは抜歯後の上皮再生は遅延することが明らかとなった．また，この遅延に MT-1/-2 欠損による活性酸素消去機能の欠失が関与している可能性が示唆された．

緒言

メタロチオネイン(MT)は、カドミウム(Cd)を投与した馬の腎臓において見出された低分子量の金属結合タンパク質である¹⁾。サブタイプとしてMT-1, -2, -3, -4の4種類が報告されており、マウスではMT-1が、ヒトではMT-2が量的に優位な発現を示すことが知られている²⁾。さらに、MT-1は肝臓、腎臓や皮膚を始めとする多くの臓器や組織での発現が認められており、MT-2と共に、生体に普遍的に存在し、種々の生理機能を発揮する主要なサブタイプであると考えられている³⁾。

MT-1およびMT-2(MT-1/-2)は、亜鉛(Zn)やCdを始めとする重金属、放射線や紫外線などの物理的刺激、薬物などの化学物質、インターロイキン-6やグルコルチコイドなどの炎症性サイトカインやホルモン、および、精神的および肉体的ストレスや酸化ストレスなど、多様な刺激によって発現誘導されることが知られている^{2,4)}。誘導因子と被誘導分子の機能とは密接に関連していることが考えられることから、種々の場面での役割が検討され、MT-1/-2の主な生理機能として、これまでに、Cd、水銀などによる重金属毒性の軽減やZn、銅などの必須微量元素の恒常性維持、および活性酸素消去能などの事象が報告されている^{2,4)}。

生体は、その活動に微量の金属元素を必要とする。MT-1/-2が生体内濃度の調節に関与するZnはその1つであり、必須微量元素として生体内で多様なタンパク質と結合し、構造の維持や酵素活性の補因子として生理的な機能を果たしている⁵⁻⁸⁾。Zn²⁺と結合することにより活性化する亜鉛要求性酵素と呼ばれる一連の酵素は、細胞内外で多様な反応に関与しており、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼやATP代謝酵素など、細胞増殖にも重要な酵素が多く含まれている。したがって、Zn不足は、細胞増殖の抑制や創傷治癒の遅延を招く⁹⁻¹¹⁾。

MT-1/-2は、皮膚の創傷治癒時に誘導されることから、細胞増殖や創傷治癒への関与が示唆されている。しかし、これまでの研究

の多くは MT-1/-2 のタンパク質，あるいは mRNA の発現部位と Zn 集積部位や細胞増殖マーカーの発現部位を比較検討し，関連性を示唆するものであり^{12),13)}，MT-1/-2 欠損マウスを用いて野生型マウスとの組織修復の差異を報告した研究は見当たらず，MT-1/-2 が創傷治癒に関わる機序の詳細は未だ明らかになっていない．

一方，口腔内に生じた創傷は，口腔外，例えば，皮膚の創傷よりも早く治癒することが知られている¹⁴⁾．これには，唾液含有物質¹⁵⁾や温度感受性イオンチャネル¹⁶⁾の関与が示唆されているが，口腔内は湿潤環境下での上皮再生でもあり，関与因子の影響が乾燥環境下での上皮再生とは異なる可能性も想定される．

そこで本研究では，MT-1/-2 欠損マウスと野生型マウスを用い，抜歯後組織修復における MT-1/-2 の関与について，抜歯窩の上皮再生と歯槽部骨新生の両面から検討した．

実験材料及び方法

1. 実験動物

実験動物は，MT-1/-2 欠損マウス(129S7/SvEvBrd-Mt1^{tm1Bri}Mt2^{tm1Bri}/J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)，および，その野生型マウス(129S1/SvImJ, The Jackson Laboratory)を購入し，それぞれ自家繁殖させて用いた．

マウスは，温度 23 ± 2℃，湿度 50 ～ 60%，12 時間周期の明暗サイクル(点灯 7:00 ～ 19:00)環境下で，滅菌水および滅菌飼料(Hi-Durability IRRD M/R 30kGy 放射線照射飼料, PMI Nutrition International, CA, USA)を自由摂取させて飼育した．また，抜歯後は抜歯窩への刺激を防止するため，マウスには滅菌水で軟化させた飼料(CMF スプラウト 30kGy 照射済, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京, 日本)を与えた．

本研究には，MT-1/-2 欠損マウスを 125 匹，野生型マウスを

122 匹用いた．なお，抜歯に際し，残根した個体あるいは根はそれぞれのサンプル数から除外した．また，サンプル数は，それぞれの図に記載した．

全ての動物実験は松本歯科大学動物実験取扱規定に従い，松本歯科大学動物実験委員会の承認の下，実施した（承認番号：367）．また，遺伝子組み換え動物は，松本歯科大学遺伝子組換え生物等安全管理委員会の承認の下，使用した（承認番号：19-2）．

2. 材料

ペントバルビタールは共立製薬株式会社（東京，日本）から購入した．また，家兔抗 MT-1/-2 抗体（Anti-MT 1/2）はフロンティア研究所（北海道，日本），ラット抗マウス proliferation marker protein Ki-67（Ki-67）抗原モノクローナル抗体（Monoclonal Rat Anti-Mouse Ki-67 Antigen Clone TEC-3）は DAKO Cytomation（Copenhagen, Denmark），西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラットイムノグロブリン G〔重鎖+軽鎖〕（HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rat IgG（H+L））は Proteintech（Rosemont, IL, USA），正常ヤギ血清は Vector Laboratories, Inc.（Newark, CA, USA），ヘマトキシリンは Merck（Kenilworth, NJ, USA），エオシン Y はナカライテスク株式会社（京都，日本），（±）- α -トコフェロールは富士フイルム和光純薬株式会社（大阪，日本）から，それぞれ入手した．その他の試薬は，ナカライテスクおよび富士フイルム和光純薬株式会社（大阪，日本）から購入した．

3. 抜歯操作

抜歯実験には，雄性，28 日齢の MT-1/-2 欠損マウス，および野生型マウスを用いた．マウスにペントバルビタールを腹腔内投与（50 mg/kg）し，マウスを開口固定後，有鉤ピンセットを用いて上顎

右側第一臼歯を抜歯した。

4. 組織学的評価

上皮組織における MT-1/-2, および Ki-67 の発現評価には, 野生型マウスを用いた。抜歯 0, 3, 5, 7 日後に, ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg) で 4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定し, 上顎骨を採取した。採取した上顎骨は, 4℃で一晩, 後固定した後, 10% EDTA (pH 7.0) で 3 週間脱灰し, パラフィン包埋を行った。包埋した各上顎骨は 3 μm に薄切し, HE 染色, 免疫組織染色 (抗 Ki-67 抗体, 抗 MT-1/-2 抗体) を行った。

1) HE 染色

染色前処理として, 組織切片を保温器内で熱処理した (60℃, 20 分間)。パラフィン除去後, アルコールを用いて段階的に脱水処理を行い, 0.2% ヘマトキシリン水溶液, および 0.25% エオジン水溶液で染色した。

2) 抗 Ki-67 染色

染色前処理として, 組織切片を 1 mM EDTA 含有 10 mM トリス緩衝液 (pH 9.0) を使用し, 100℃で 20 分間熱処理した。0.3% H₂O₂ (室温, 30 分間) で内因性ペルオキシダーゼを除去し, 1% 正常ヤギ血清でブロッキング処理 (室温, 30 分間) した後, 一次抗体 (Monoclonal Rat Anti-Mouse Ki-67 Antigen, 1:25) を 4℃で一晩, 反応させた。その後, 二次抗体 (HRP-conjugated Goat Anti-Rat IgG (H+L), 1:1000) を, 室温で 2 時間反応させた。Ki-67 の局在は 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) を用いて可視化した。

3) 抗 MT-1/-2 染色

組織切片を 0.01M クエン酸溶液 (pH 6.0) に浸漬し、マイクロ波処理 (550W, 20 秒毎, 計 5 分間) した。次いで、0.3% H_2O_2 (室温, 30 分間) で内因性ペルオキシダーゼを除去し、1% 正常ヤギ血清でブロッキング処理 (室温, 30 分間) した後、一次抗体 (家兎抗 MT-1/-2 抗体, 1:2000) を 4℃ で一晚、反応させた。その後、二次抗体 (HRP conjugate-Goat anti-rabbit IgG [H+L], 1:100) を、室温で 2 時間反応させた。MT-1/-2 の局在は DAB を用いて可視化した。

5. 野生型マウスおよび MT-1/-2 欠損マウスにおける抜歯窩創傷治癒評価

抜歯 0, 3, 5, 7 日後にペントバルビタール麻酔下 (腹腔内投与, 50 mg/kg) で、上顎骨を採取した。OLYMPUS システム実体顕微鏡 (オリンパス株式会社, 東京, 日本) に、実体顕微鏡部品接眼レンズ DM-5000 シリーズ顕微鏡デジタルシステム (佐藤商事, 神奈川, 日本) を装着して、採取した上顎骨の抜歯部位の実体顕微鏡画像を撮影した。創傷面積は、パーソナルコンピューターに取り込んだ画像を NIH ImageJ ver.1.52a で計測し、算出した。なお、測定値は、3 回計測した平均値を採用した。また、残根した個体は除外して評価した。

6. 野生型マウスおよび MT-1/-2 欠損マウスにおける抜歯窩歯槽部の骨新生評価

採取した上顎骨を X 線 CT 装置 (ScanXmate-A080; コムスキャンテクノ株式会社, 神奈川, 日本) を用いて撮影 (30 kV, 250 mA) した。撮影した μ CT 画像を計測ソフトウェア (TRI/3D-BON; ラトックシステムエンジニアリング株式会社, 東京, 日本) を用いて解析し、抜歯窩歯槽部 (近心根, 遠心根, 口蓋根) の骨密度 (新生骨体積 / 抜歯窩歯槽部体積, %) を算出した。なお、測定値は、

3 回計測した平均値を採用した．また，残根は除外して評価した．

7. MT-1/-2 欠損マウスにおける抜歯窩創傷治癒に対する α -トコフェロールの効果

抜歯前日より， α -トコフェロール (150 mg/kg ， 0.1 mL/10 g) を腹腔内投与したマウスの上顎右側第一臼歯を抜歯し，3 日後に上顎骨を採取した．対照群にはコーン油 (0.1 mL/10 g) を腹腔内投与した．なお， α -トコフェロールはコーン油を溶媒として $17) 15\text{ mg/mL}$ に調整し，1 日 1 回，上顎骨採取の 1 日前まで行った．

8. 統計処理

MT-1/-2 欠損マウスと野生型マウスの比較検定には，創傷面積では Welch の t 検定を，骨密度では Mann-Whitney の U 検定を用いた．なお，有意水準は 5% とし，有意確率が 5% 未満 ($p < 0.05$) を有意差ありと評価した．

結果

1. 野生型マウスにおける抜歯窩上皮再生の組織学的評価

1) HE 染色像

抜歯 3 日後では，抜歯窩直上の上皮は欠如しており，偽膜が認められた．なお，偽膜下結合組織には，線維芽細胞や炎症性細胞の浸潤が認められた．また，再生上皮最先端部は，抜歯 0 日後と比較し，抜歯窩中央部に向けて伸展していた．

さらに，抜歯窩歯槽部では，肉芽組織の形成が認められた [図 1-(A)(B)]．

抜歯 5 日後では，抜歯窩は上皮による被覆は完了しておらず，一部，偽膜が残存していた．しかし，再生上皮最先端部は，抜歯 3 日後と比較し，さらに抜歯窩中央部に向けて伸展していた．また，再

生上皮最先端部では，上皮の重層化が認められた．一方，偽膜周囲に毛細血管と線維芽細胞の密な増殖が認められた．さらに，抜歯窩では，肉芽組織の増殖と新生骨の形成が認められた [図 1-(C)]．

抜歯 7 日後では，抜歯窩は重層化した再生上皮で被覆されており，その再生上皮下では，毛細血管と線維芽細胞の密な増殖を認めた．また，抜歯窩では，新生骨量が増加していた [図 1-(D)]．

2) Ki-67 と MT-1/-2 の発現

再生上皮および残存上皮において，Ki-67 は基底細胞，および傍基底細胞に発現していた [図 2-(B),(E),(H),(K)]．これに対し，MT-1/-2 は基底細胞，傍基底細胞，および有棘細胞に発現しており，その発現は Ki-67 と比較し，多種の細胞に認められた [図 2-(C),(F),(I),(L)]．なお，Ki-67 と MT-1/-2 の発現領域は近似していた．

一方，再生上皮最先端部では，Ki-67 と MT-1/-2 の発現は共に認められなかった [図 2-(E),(F),(H),(I),(K),(L)]．

2. 野生型マウスおよび MT-1/-2 欠損マウスにおける抜歯窩創傷治癒

抜歯後の創傷面積は，両マウスともに経時的に減少したが，野生型マウスに比べ，MT-1/-2 欠損マウスで，その減少は遅れていた (図 3, 4)．

また，抜歯 3, 7 日後における MT-1/-2 欠損マウスの創傷面積は，野生型マウスに比べて有意に高値であった (図 4)．

3. 野生型マウスおよび MT-1/-2 欠損マウスにおける抜歯窩歯槽部の骨新生

抜歯窩歯槽部 (近心頬側根，遠心頬側根，口蓋根) の新生骨密度は，両マウスで経時的に増加した (図 5, 6) が，どの部位においても野生型マウスと MT-1/-2 欠損マウスとの間に，有意な差は認めら

れなかった(図 6)。

4. MT-1/-2 欠損マウスにおける抜歯窩創傷治癒に対する α -トコフェロールの効果

抜歯 3 日後における α -トコフェロール投与群(実験群)の創傷面積は、コーン油投与群(対照群)と比較し、有意に減少していた(図 7)。

考察

MT-1/-2 には、細胞増殖との関連が指摘されている。Karasawa らは、正常皮膚ではその発現は弱いものの、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)やコレラ毒素を塗布することにより過形成を起こした皮膚では、基底層に MT-1 が強く発現することを報告した¹⁸⁾。また、Iwata らは、実験的皮膚創傷治癒時に、再生上皮に MT-1 mRNA の発現を認め、その後、上皮組織に Zn が蓄積することを報告している¹²⁾。さらに、Hanada らは、コレラ毒素、TPA および紫外線照射による皮膚の過形成を MT-1/-2 欠損マウスと野生型マウスを用いて検討し、MT-1/-2 欠損マウスでは皮膚厚の増加は認められず、皮膚厚が野生型マウスと比較して有意に低値であることを報告している¹⁹⁾。しかし、MT-1/-2 欠損マウスと野生型マウスを比較して、口腔内の創傷治癒に対する MT-1/-2 の関与を検討した報告はこれまで見当たらず、本研究はその端緒となる。

本研究では、抜歯後の残存上皮および再生上皮において、MT-1/-2 は基底細胞、傍基底細胞および有棘細胞に発現していた。細胞増殖マーカーの1つである Ki-67 と比較し、MT-1/-2 の発現は多種の細胞に認められ広範囲であったが、発現領域は近似するとの結果が得られた。再生上皮で細胞増殖している部位と MT-1/-2 の発現部位に重なりが認められることから、この結果は、これまでの

報告と同様，細胞増殖と MT-1/-2 との間に関連がある可能性を示唆するものであると考えられる．細胞周期において Ki-67 は，G1，S，G2，および M 期で優先的に発現する核タンパク質であり²⁰⁾，細胞増殖が盛んな部位に発現することが知られている．一方，MT-1/-2 も細胞周期依存的な発現を示すタンパク質であり，その細胞内局在は細胞周期により変化する．すなわち，G0 期，G1 期では細胞質中に存在する MT-1/-2 は，G1 後期および S 期に細胞質内濃度が最も高くなり，Zn とともに核に移行するが，その後，G2/M 期に移行すると，再び細胞質に移行することが報告されている²¹⁻²³⁾．この MT-1/-2 の細胞内移動は，Zn²⁺ の細胞内移動や酸化ストレスからの DNA 保護に関与し²⁴⁾，細胞増殖に寄与していることが考えられる．なお，MT-1/-2 には核移行シグナルは存在しないが，G1/S 期において核移行する要因の1つとして，mRNA が核周辺の細胞骨格に局在することが考えられている²⁵⁾．

興味深いことに，再生上皮最先端部では，MT-1/-2 および Ki-67 双方の発現が認められなかった．本研究では，5-ブロモ-2'-デオキシウリジンを利用して DNA 合成を検出するなど，他の方法で再生上皮最先端部での細胞増殖を検討しておらず，最先端部で活発な細胞増殖が起こっているのか否かの確証は得られていない．しかし，Betz らは，ヒトの皮膚創傷において Ki-67 が皮膚最先端部には発現しておらず，むしろ基部となる部分での発現を認め，「細胞増殖は創傷最先端から離れた部分でおこり，最先端部に向け進展する」との仮説を提唱した²⁶⁾．細胞増殖が盛んであると考えられる再生上皮最先端部で，Ki-67 が発現していないことの理由は未だ不明であるが，本研究で得られた結果は，Betz らが提唱した仮説と一致するものであり，この最先端部分が細胞周期に入っていない細胞であると考ええると，MT-1/-2 が Ki-67 と同様に発現していないことは，逆説的に MT-1/-2 が細胞増殖に関与していることを示唆すると考えられる．

胎生 11 日の野生型および MT-1/-2 欠損マウス胎児から採取

した線維芽細胞に SV40 を導入して不死化し、*in vitro* で検討した結果として、両者の増殖に有意な差は認められないことが報告されている²⁷⁾。このことは、MT-1/-2 欠損により細胞が増殖する基本的機構の障害はなく、活性酸素存在下や Zn 欠乏状態でなければ、正常に増殖することを示している。すなわち、MT-1/-2 欠損マウスが正常に生まれることなどから、MT-1/-2 は、定常状態における Zn 代謝に本質的な重要性は低く、外部要因等による恒常性攪乱時の Zn 調節において機能を担っている可能性が示唆されている²⁸⁾。

MT-1/-2 は紫外線や放射線により発現誘導されるが²⁾、分子内に豊富に存在するシステインのチオール基を介して活性酸素を消去する機能を有することから、これら外部刺激によって産生される活性酸素から生体を保護することが報告されている⁴⁾。また、MT-1 は活性酸素種の中でもヒドロキシラジカルに、より特異性が高く、グルタチオンのおよそ 300 倍もの消去効率を示すことが知られている²⁹⁾。

炎症組織では、マクロファージや好中球などの食細胞からヒドロキシラジカルなどの活性酸素種が産生される³⁰⁾。活性酸素種は、細胞内殺菌に機能する一方³¹⁾、細胞外に多量に放出されると細胞を障害することから、炎症時の組織修復を抑制している可能性が考えられる^{30,32)}。したがって、今回、ヒドロキシラジカル消去作用を有する α -トコフェロールを用いて、MT-1/-2 欠損マウスにおける抜歯後上皮再生における影響を検討した結果、抜歯後早期において、対照群と比較し、創傷治癒が早まるとの結果が得られた。このことは、野生型マウスでは、MT-1/-2 が抜歯後の炎症反応を介して産生される活性酸素種から増殖細胞を保護していたことを示していると考えられる。

α -トコフェロールは、天然に存在するトコフェロール同族体(α -、 β -、 γ -、 δ -体)の中では最も抗酸化活性が高く³³⁾、脂溶性であることから生体の疎水性部分に分布し、細胞膜やその周辺、すなわ

ち細胞内で抗酸化作用を発揮すると考えられている³⁴⁾。一方，**MT-1/-2** は細胞内で抗酸化機能を発現していると考えられることから³⁵⁾，細胞内での抗酸化作用を考慮し，本研究では，細胞外の水層に作用点を持つ水溶性のビタミン C ではなく，脂溶性の α -トコフェロールを使用した。

本研究では，抜歯後の上皮再生が **MT-1/-2** 欠損マウスで遅延する機序に関わる因子の手掛かりを得る目的で α -トコフェロールを使用したため，野生型マウスにおける α -トコフェロールの影響は検討していない。しかし， α -トコフェロールは **MT** を誘導し^{36, 37)}，さらに，**MT** と抗酸化物質 (α -トコフェロール，アスコルビン酸) との複合適用は，Cd 投与により誘発される酸化ストレスと肝細胞増殖抑制を軽減することから³⁸⁾，野生型マウスにおいても α -トコフェロールによる上皮再生促進作用が期待できる。

抜歯は，歯科医療において一般的な処置であるが，上皮組織の再生と骨新生を同時に観察することが可能であり，**MT-1/-2** の生理機能を探索する上で，非常に有用なモデルの1つであると考えられる。

今回，抜歯窩の上皮修復に期間を合わせて，歯槽部における骨新生を検討したが，抜歯後 7 日間では，野生型マウスと比較し，**MT-1/-2** 欠損マウスで骨密度は低値となる傾向が認められたが，抜歯窩歯槽部の骨新生に **MT-1/-2** の有無による有意な差異は認められなかった。

骨代謝に対する **MT-1/-2** の関与については，イタイイタイ病との関連から，Cd を投与した実験系において重金属毒性軽減作用を検討した研究報告が多いが^{39, 40)}，一部，Zn 代謝との関連に着目した報告も存在する。Oda らは，対照ラットにおいて，破骨細胞に **MT-1/-2** が定常的に発現していることを見出し，骨代謝における **MT** と破骨細胞との関連を示唆した⁴¹⁾。また，Dohi らは，ラット骨髄由来間葉系幹細胞の培養系を用いて検討し，**MT-1/-2** が培養初期の骨髄間葉系幹細胞で産生され，骨芽細胞への分化と石灰

化に関与していることを報告している⁴²⁾。さらに、Fong らは、MT-1/-2 欠損マウスにおける骨の劣成長を報告した⁴³⁾。彼らは、3.5 週齢の雌性マウスを使用して、低 Zn 含有(2.5 mg/kg diet)飼料と十分量 Zn 含有(15 mg/kg diet, 50 mg/kg diet)飼料を 5 週間あるいは 9 週間摂食させた後、体重、体長および脛骨長を野生型マウスと比較し、MT-1/-2 欠損マウスではこれらが有意に低値であることを報告している。以上より、抜歯窩歯槽部における骨新生においても MT-1/-2 欠損の影響が考えられたが、その違いを見出すことはできなかった。その理由としては、抜歯窩の治癒過程では、骨組織修復よりも上皮組織修復が先行することから、骨組織において MT-1/-2 の関与を検討する目的としては、観察期間が短かった可能性が考えられる。

創傷治癒時の Zn による促進的役割や活性酸素による抑制的影響など、創傷治癒に関わる機構に口腔内と口腔外とで基本的な違いはないと考えられる。しかし、皮膚では、活動期での受傷は休息期での受傷よりも治癒の速いことが報告されている一方⁴⁴⁾、本研究の補助データとして、午前 8 時(8:00)に抜歯した時と午後 6 時(18:00)に抜歯した時とで、抜歯 7 日後の創傷面積に有意な差は認められない(野生型マウス[8:00 vs 18:00]: 0.087 ± 0.042 mm² vs 0.050 ± 0.036 mm², n=9, p>0.05; MT-1/-2 欠損マウス [8:00 vs 18:00]: 0.130 ± 0.044 mm² vs 0.117 ± 0.078 mm², n=13, p>0.05)との結果を得ている。これは、抜歯窩創傷治癒に皮膚創傷とは異なる部分がある可能性を示唆するものであると考える。

本研究により、MT-1/-2 は抜歯窩上皮再生にも関与していることが明らかとなった。しかし、観察時間を上皮組織の修復に合わせて設定したため、上皮再生よりも遅れて完了する抜歯窩骨新生に、MT-1/-2 が関与しているのか否かを判定するには至らなかった。また、今回、再生上皮における MT-1/-2 と Ki-67 の発現領域の近似を認めたが、同一細胞での共発現については検討できていない。

これらは非常に興味深いところであるが，その詳細を明らかにするためには，今後さらなる検討が必要である．

結 論

抜歯窩上皮再生は，野生型マウスに比べて MT-1/-2 欠損マウスで遅延することが明らかになった．また，その機序の1つとして，MT-1/-2 欠損による活性酸素消去機能の欠失が関与している可能性が示唆された．

謝 辞

本研究に際し，終始御懇意なる御指導を賜りました松本歯科大学大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座 遺伝子工学・分子創薬学専攻分野 十川紀夫教授，松本歯科大学病理学講座 村上聡教授，松本歯科大学地域連携歯科学講座 薮島弘之教授，並びに，松本歯科大学大学院歯学独立研究科 硬組織疾患病体解析学講座 硬組織疾患病態解析学専攻分野 長谷川博雅教授に謹んで謝意を申しあげます．

さらに，本研究に多大なる，ご指導，御助言を賜りました松本歯科大学病理学講座 嶋田勝光講師に厚く感謝申し上げます．また，本研究の遂行および論文の作成にあたり，御助言，御協力頂きました松本歯科大学小児歯科学講座 大須賀直人教授，愛知医科大学歯科口腔外科学講座 各務秀明教授，日本体育大学医療専門学校 富田美穂子博士，広島工業大学 生命学部 生体医工学科 十川千春教授の各先生に御礼申し上げます．

最後に，この研究を絶えず支え励ましてくれました両親（明彦，貴美），祖父（弘）に心から感謝いたします．

参考文献

1. Kägi JH, Vallee BL (1960) Metallothionein: a Cadmium- and Zinc-containing Protein from Equine Renal Cortex. *J Biol Chem* 235(12): 3460-3465.
2. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59(4):627-647.
3. Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M (2011) A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol* 9:54.
4. Min KS (2007) Physiological significance of metallothionein in oxidative stress *Yakugaku Zasshi* 127(4):695-702.
5. Maret W, Li Y (2009) Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev* 109(10):4682-707.
6. Fukada T, Kambe T (2011) Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics* 3(7):662-674.
7. Hara T, Takeda TA, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, Fukada T (2017) Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci* 67(2):283-301.
8. Kambe T, Matsunaga M, Takeda TA (2017) Understanding the Contribution of Zinc Transporters in the Function of the Early

- Secretory Pathway. *Int J Mol Sci* 18(10):2179.
9. Prasad AS (1983) Zinc deficiency in human subjects. *Prog Clin Biol Res* 129:1-33.
10. Kogan S, Sood A, Garnick MS (2017) Zinc and Wound Healing: A Review of Zinc Physiology and Clinical Applications. *Wounds* 29(4):102-106.
11. Lansdown AB, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Agren MS (2007) Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen* 15:2-16.
12. Iwata M, Takebayashi T, Ohta H, Alcalde RE, Itano Y, Matsumura T (1999) Zinc accumulation and metallothionein gene expression in proliferating epidermis during wound healing in mouse skin. *Histochem Cell Biol* 112(4):283-290.
13. Ågren MS, Chafrańska L, Eriksen JO, Forman JL, Bjerrum MJ, Schjerling P, Larsen HF, Cottarelli E, Jorgensen LN, Gjerdrum LMR (2021) Spatial expression of metallothionein, matrix metalloproteinase-1 and Ki-67 in human epidermal wounds treated with zinc and determined by quantitative immunohistochemistry: A randomised double-blind trial. *Eur J Cell Biol* 100(3):151147.
14. Glim JE, van Egmond M, Niessen FB, Everts V, Beelen RH (2013) Detrimental dermal wound healing: what can we learn from the oral mucosa? *Wound Repair Regen* 21(5):648-660.

15. Imamura Y, Fujigaki Y, Oomori Y, Usui S, Wang PL (2009) Cooperation of salivary protein histatin 3 with heat shock cognate protein 70 relative to the G1/S transition in human gingival fibroblasts. *J Biol Chem* 284(21): 14316-14325.
16. Aijima R, Wang B, Takao T, Mihara H, Kashio M, Ohsaki Y, Zhang JQ, Mizuno A, Suzuki M, Yamashita Y, Masuko S, Goto M, Tominaga M, Kido MA (2015) The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia *FASEB J* 29(1):182-192.
17. Wurlina W, Mustofa I, Meles DK, Safitri E, Susilowati S, Mulyati S, Utomo B, Utama S. (2022) α -Tocopherol restores semen quality in rats exposed to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin. *Vet World* 15(2):316-323.
18. Karasawa M, Nishimura N, Nishimura H, Tohyama C, Hashiba H, Kuroki T (1991) Localization of metallothionein in hair follicles of normal skin and the basal cell layer of hyperplastic epidermis: possible role association with cell proliferation. *J Invest Dermatol* 97(1):97-100.
19. Hanada K, Sawamura D, Hashimoto I, Kida K, Naganuma A (1998) Epidermal Proliferation of the Skin in Metallothionein-Null Mice. *J invest Dermatol* 110(3):259-262.
20. Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, Stangner K, Müller GA, Engeland K (2021) Ki-67 gene

- expression. *Cell Death Differ* 28(12): 3357-3370.
21. Tsujikawa K, Imai T, Kakutani M, Kayamori Y, Mimura T, Otaki N, Kimura M, Fukuyama R, Shimizu N (1991) Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes. *FEBS Lett* 283(2), 239-242.
22. Nagel WW, Vallee BL (1995) Cell cycle regulation of metallothionein in human colonic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:579-583.
23. Apostolova MD, Cherian MG (2000) Delay of M-phase onset by phidicolin can retain the nuclear localization of zinc and metallothionein in 3T3-L1 fibroblasts. *J Cell Physiol* 183(2): 247-253.
24. Levadoux-Martin M, Hesketh JE, Beattie JH, Wallace HM (2001) Influence of metallothionein-1 localization on its function. *Biochem J* 355(Pt2):473-479.
25. Levadoux M, Mahon C, Beattie JH, Wallace HM, Hesketh JE (1999) Nuclear import of metallothionein requires its mRNA to be associated with the perinuclear cytoskeleton. *J Biol Chem* 274(49):34961-34966.
26. Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Penning R, Eisenmenger W (1993) The time-dependent localization of Ki67 antigen-positive cells in human skin wounds. *Int J Legal Med* 106(1):

35-40.

27. Armendáriz AD, Olivares F, Pulgar R, Loguinov A, Cambiazo V, Vulpe CD, González M (2006) Gene expression profiling in wild-type and metallothionein mutant fibroblast cell lines. *Biol Res* 39(1):125-142.
28. Kondoh M, Sato M (2000) Protective Stress Responsive Protein: Metallothionein. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 56(4):634-640.
29. Thornalley PJ, Vasak M (1985) Possible role for metallothionein in protection against radiation -induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* 827(1): 36-44.
30. Yoshikawa T, Yoshida N, Kondo M (1993) Role of oxygen-derived free radicals in inflammation. *Japanese Journal of Inflammation* 13(5):413-421.
31. Martin P (1997) Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309): 75-81.
32. Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, Kan YW, Werner S (2002) Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol* 22(15):5492-5505.
33. Itoh S, Nagaoka S, Mukai K, Ikesu S, Kaneko

- Y (1994) Kinetic study of quenching reactions of singlet oxygen and scavenging reactions of free radicals by alpha-, beta-, gamma- and delta- tocopheramines in ethanol solution and micellar dispersion. *Lipids* 29(11):799-802.
34. Niki E, Kawakami A, Yamamoto Y, Kamiya Y (1985) Oxidation of Lipids. VIII. Synergistic Inhibition of Oxidation of Phosphatidylcholine Liposome in Aqueous Dispersion by Vitamin E and Vitamin C. *Bull Chem Soc Jpn* 58 (7):1971-1975.
35. Miyazaki I, Asanuma M, Kikkawa Y, Takeshima M, Murakami S, Miyoshi K, Sogawa N, Kita T (2011) Astrocyte-derived metallothionein protects dopaminergic neurons from dopamine quinone toxicity. *Glia* 59(3):435-451.
36. Wang X, Dong W, Yuan B, Yang Y, Yang D, Lin X, Chen C, Zhang W (2016) Vitamin E confers cytoprotective effects on cardiomyocytes under conditions of heat stress by increasing the expression of metallothionein. *Int J Mol Med* 37(5):1429-1436.
37. Gu Y, Lian X, Sun W, Gao B, Fu Y (2018) Diabetes Mellitus induces alterations in metallothionein protein expression and metal levels in the testis and liver. *J Int Med Res* 46(1):185-194.
38. Koyuturk M, Yanardag R, Bolkent S, Tunali S (2007) The potential role of combined anti-oxidants against cadmium toxicity on liver of

- rats. *Toxicol Ind Health* 23(7) : 393-401.
39. Habeebu SS, Liu J, Liu Y, Klaassen CD (2000) Metallothionein-null mice are more susceptible than wild-type mice to chronic CdCl₂-induced bone injury. *Toxicol Sci* 56(1):211-219.
 40. Nomiya K (1980) Recent progress and perspectives in cadmium health effects studies. *Sci Total Environ* 14(3):199-232.
 41. Oda N, Sogawa CA, Sogawa N, Onodera K, Furuta H, Yamamoto T (2001) Metallothionein expression and localization in rat bone tissue after cadmium injection. *Toxicol Lett* 123(2-3):143-150.
 42. Dohi Y, Shimaoka H, Ikeuchi M, Ohgushi H, Yonemasu K, Minami T (2005) Role of metallothionein isoforms in bone formation processes in rat marrow mesenchymal stem cells in culture. *Biol Trace Elem Res* 104(1):57-70.
 43. Fong L, Tan K, Tran C, Cool J, Scherer MA, Elovaris R, Coyle P, Foster BK, Rofe AM, Xian CJ (2009) Interaction of dietary zinc and intracellular binding protein metallothionein in postnatal bone growth. *Bone* 44(6):1151-1162.
 44. Hoyle NP, Seinkmane E, Putker M, Feeney KA, Krogager TP, Chesham JE, Bray LK, Thomas JM, Dunn K, Blaikley J, O'Neill JS (2017) Circadian actin dynamics drive rhythmic fibroblast mobilization during wound healing.

Sci Transl Med 9(415):eaal2774.

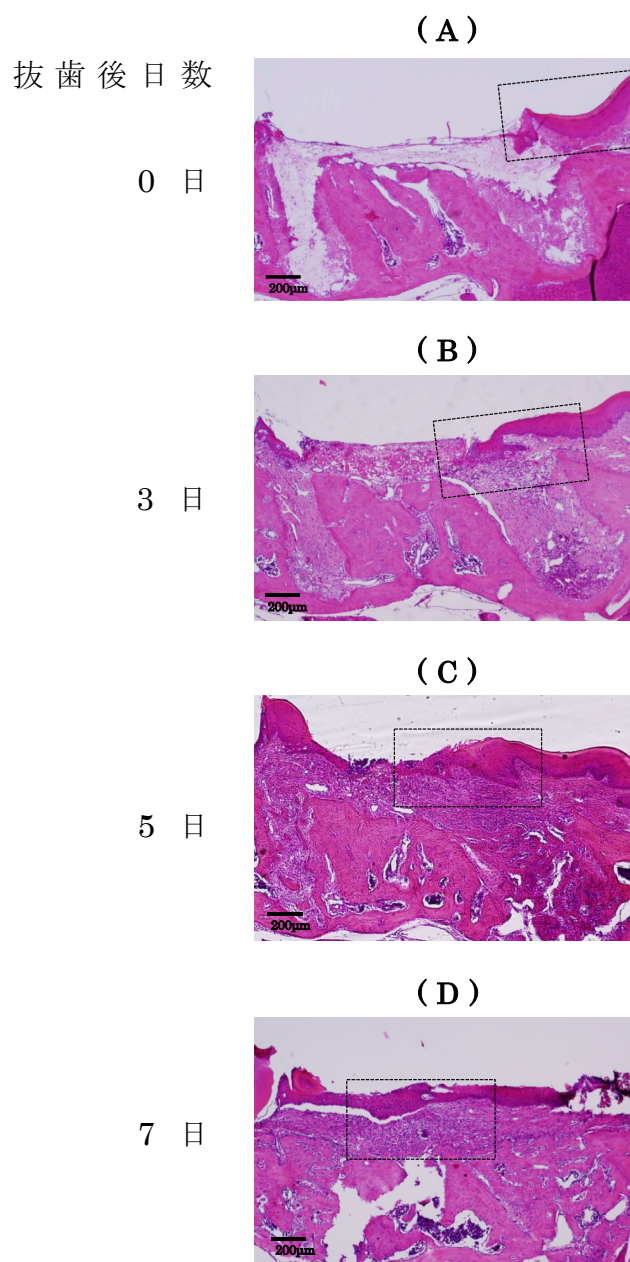


図 1. 抜歯窩の経時的組織変化

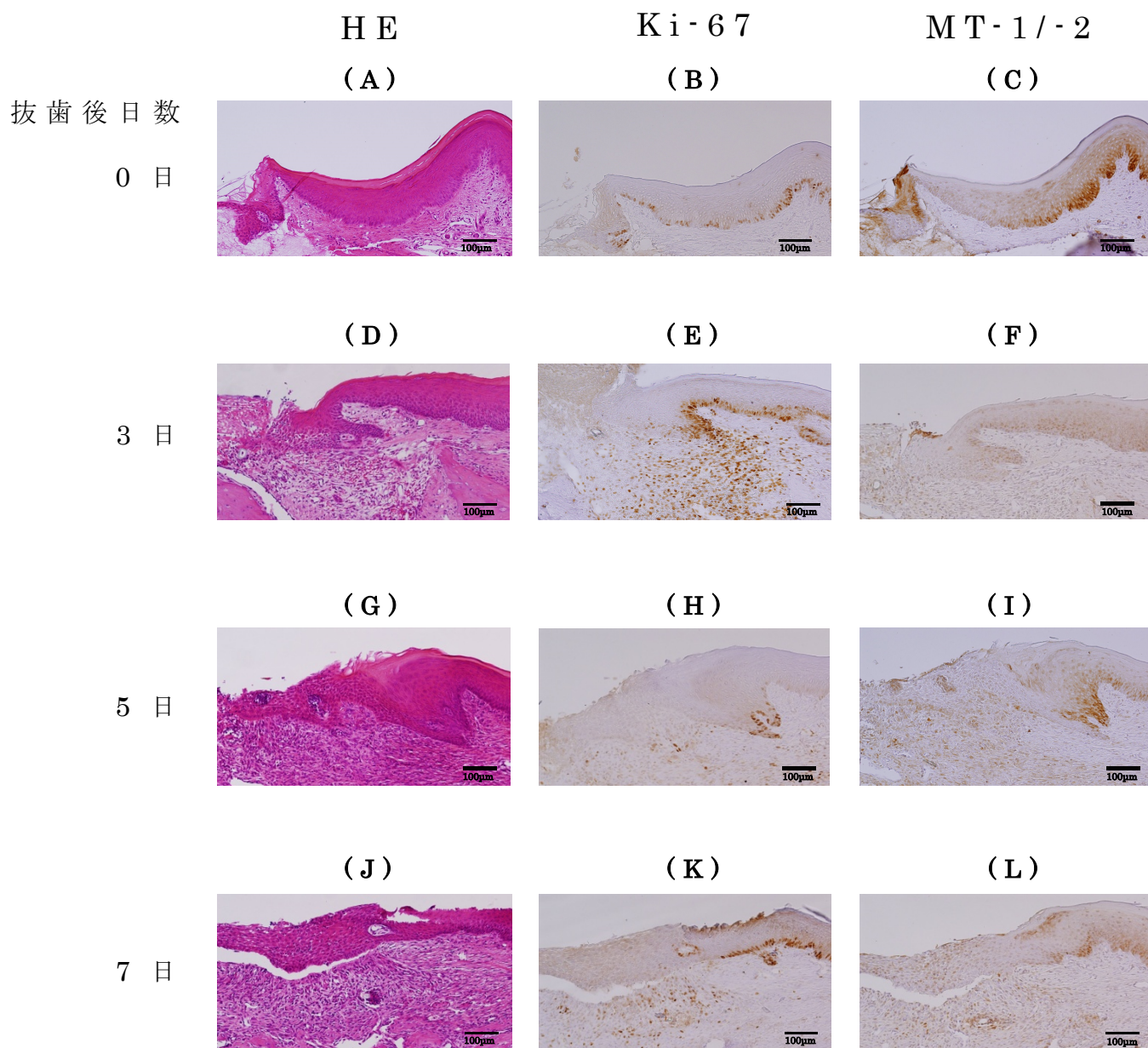


図 2. 抜歯後の残存上皮および再生上皮における
K i - 6 7 , M T - 1 / - 2 発現

抜歯後日数

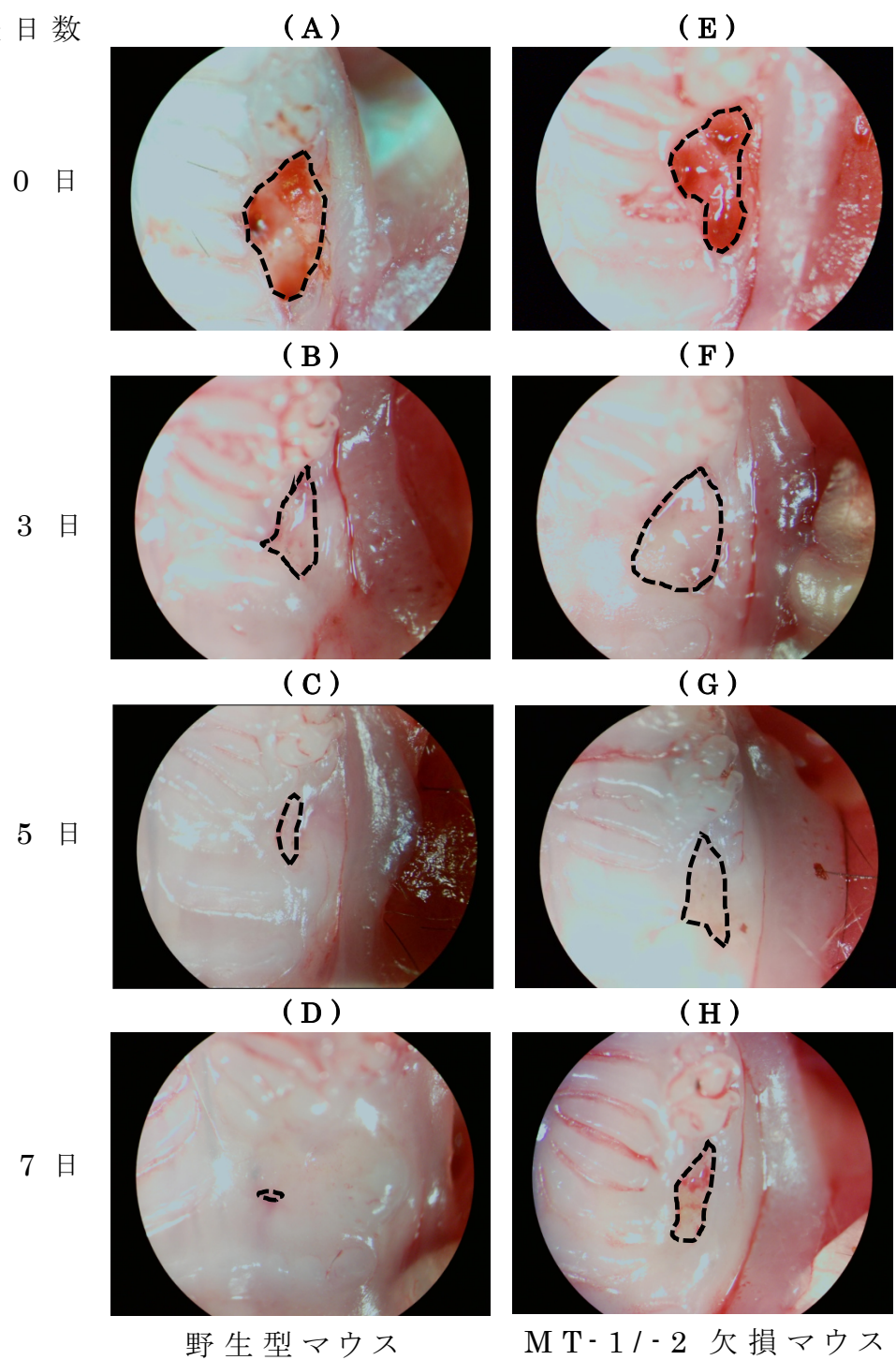


図 3. 抜歯部位の実体顕微鏡画像

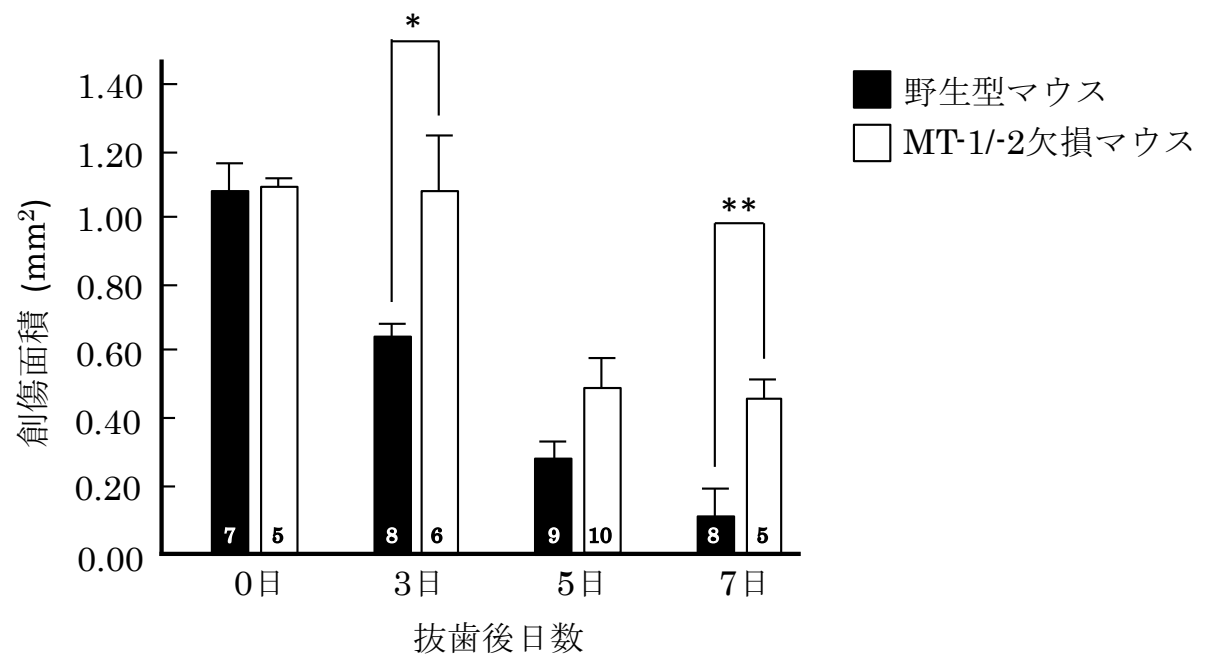


図 4. 抜歯窩創傷面積の経時的変化

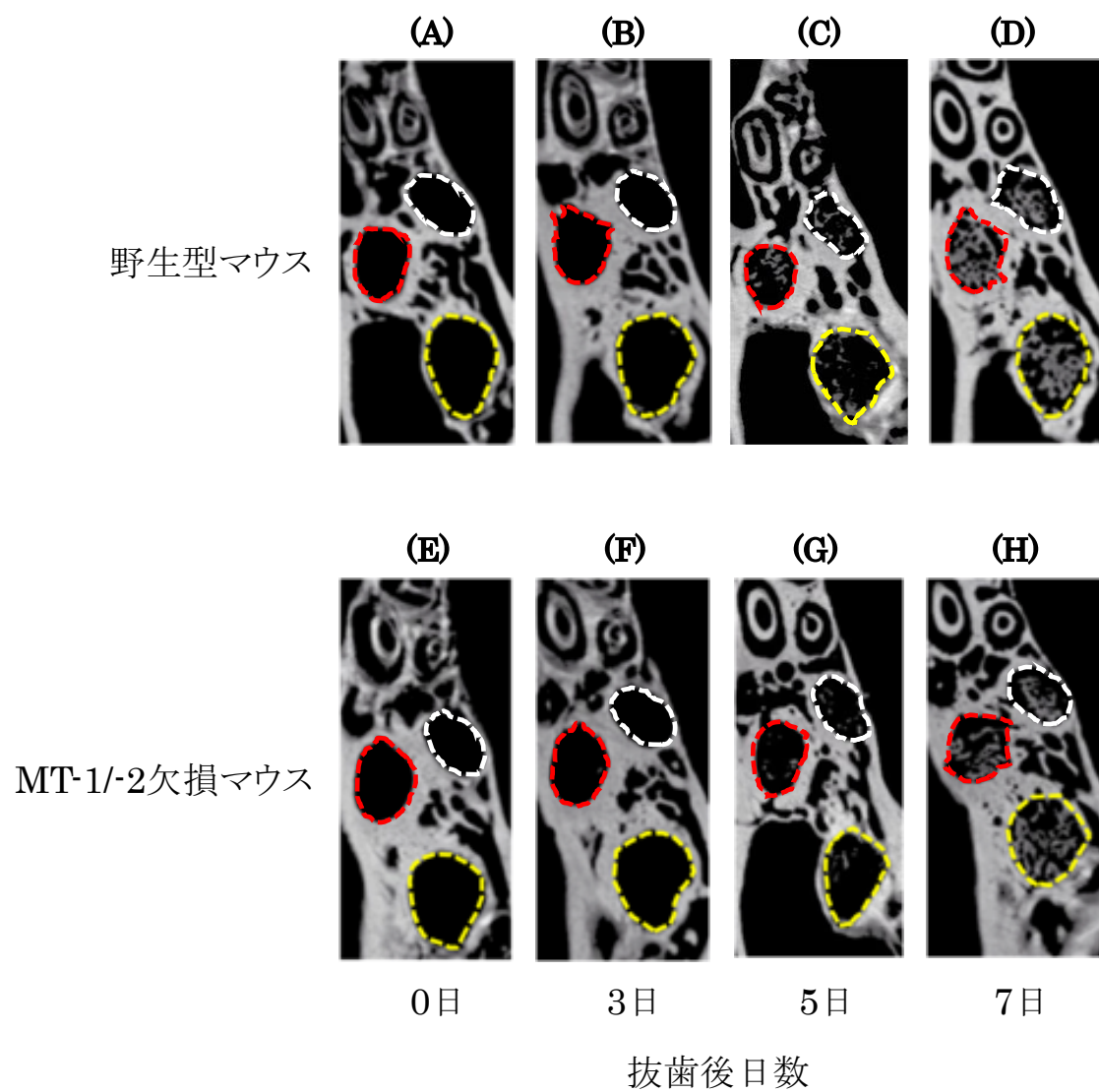


図 5. 抜歯窩骨新生の経時的変化 (μCT 画像)

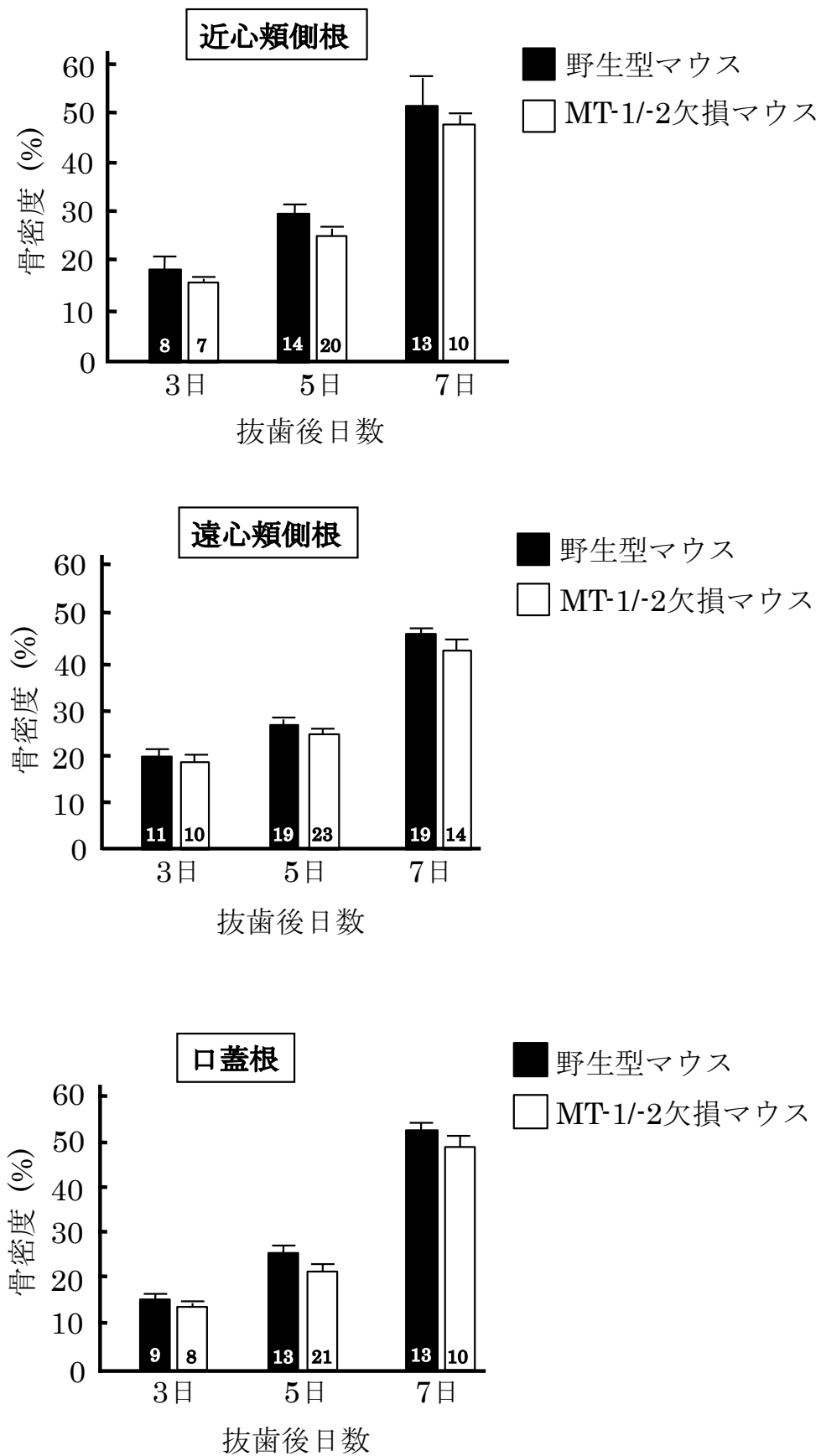


図 6. 抜歯窩歯槽部における骨密度の経時的変化

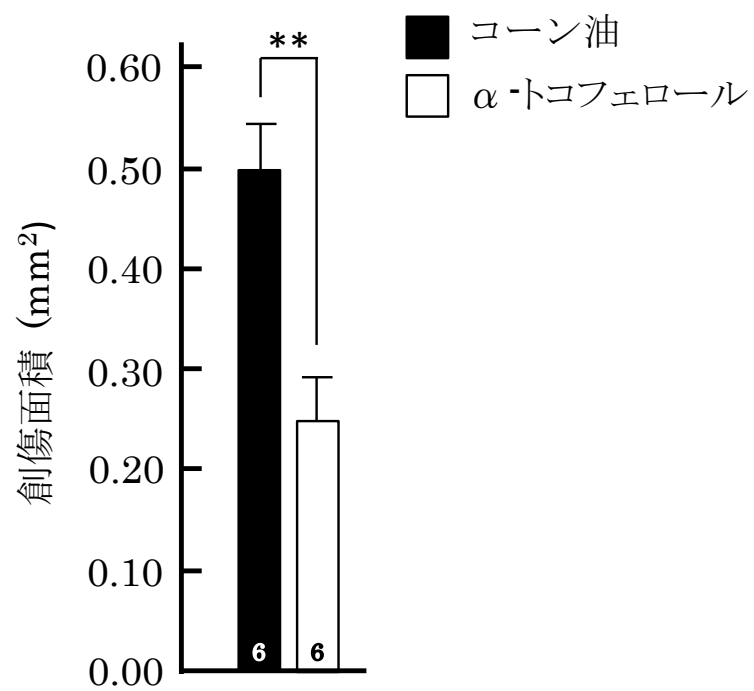


図 7. 抜歯窩創傷治癒に対する α -トコフェロールの影響

図の説明

図 1. 抜歯窩の経時的組織変化

野生型マウスを用い、抜歯 0, 3, 5, 7 日後に上顎骨を採取し、HE 染色を行った。

(A) 抜歯 0 日後

(B) 抜歯 3 日後、抜歯窩直上の上皮は欠如していたが、再生上皮最先端部は、抜歯 0 日後と比較し、抜歯窩中央部に向けて伸展していた。

(C) 抜歯 5 日後、上皮の一部が欠如しており、残存した偽膜が認められた。また、再生上皮最先端部は、抜歯 3 日後と比較し、さらに抜歯窩中央部に向けて伸展していた。また、再生上皮最先端部では、上皮の重層化が認められた。

(D) 抜歯 7 日後、抜歯窩は重層化した再生上皮で被覆されていた。
スケールバー：200 μ m

図 2. 抜歯後の残存上皮および再生上皮における Ki-67, MT-1/-2 発現

野生型マウスを用い、抜歯 0, 3, 5, 7 日後に上顎骨を採取した。抗 Ki-67 抗体染色、抗 MT-1/-2 抗体を用いて染色し、残存上皮および再生上皮における Ki-67 発現と MT-1/-2 発現を比較した。

なお、写真は、図 1 における点線枠相当部分の拡大図として示した。
縦方向配列

(A), (D), (G), (J): HE 染色像

(B), (E), (H), (K): 抗 Ki-67 抗体染色像

(C), (F), (I), (L): 抗 MT-1/-2 抗体染色像

横方向配列

(A)-(C): 抜歯 0 日後, (D)-(F): 抜歯 3 日後, (G)-(I): 抜歯 5 日後, (J)-(L): 抜歯 7 日後

スケールバー：100 μ m

図 3. 抜歯部位の実体顕微鏡画像

野生型マウスと MT-1/-2 欠損マウスを用い、抜歯 0, 3, 5, 7 日後に上顎骨を採取し、抜歯部位の実体顕微鏡画像を撮影した。

黒色破線は創傷部位外縁を示し、破線で囲まれた部位の面積を創傷面積とした(対物×5.6)。

(A)-(D): 野生型マウス

(E)-(H): MT-1/-2 欠損マウス

図 4. 抜歯窩創傷面積の経時的変化

野生型マウスと MT-1/-2 欠損マウスにおける、抜歯 0, 3, 5, 7 日後の創傷面積を比較した。データは平均値±SE (n=5-10, カラム内数字はそれぞれのサンプル数を示す), *: $p < 0.05$,

**: $p < 0.01$ (Welch の t 検定)

図 5. 抜歯窩骨新生の経時的変化

黄色破線: 近心頬側根, 白色破線: 遠心頬側根, 赤色破線: 口蓋根

(A), (B), (C), (D): 野生型マウス

(E), (F), (G), (H): MT-1/-2 欠損マウス

図 6. 抜歯窩歯槽部における骨密度の経時的変化

野生型マウスと MT-1/-2 欠損マウスにおける、抜歯 0, 3, 5, 7 日後の各抜歯窩歯槽部それぞれの骨密度を比較した。データは平均値±SE (n=7-23, カラム内数字はそれぞれのサンプル数を示す),

どの根においても経時的な野生型マウスと MT-1/-2 欠損マウスの骨密度に有意な差は認められなかった(Mann-Whitney の U 検定)。

図 7. 抜歯窩創傷治癒に対する α -トコフェロールの影響

MT-1/-2 欠損マウスを用い、 α -トコフェロール (150 mg/kg)

投与後の抜歯窩創傷面積を計測した。

抜歯の前日より 4 日間，対照群にはコーン油（0.1 mL/10 g）を，
実験群には α -トコフェロール（150 mg/kg，0.1 mL/10 g）を腹腔
内に投与した。

データは平均値 \pm SE（n=6），**： $p < 0.01$ （Welch の t 検定）