

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592713

研究課題名(和文) 歯肉付着上皮細胞におけるタイト結合構成タンパク質とバリア機構

研究課題名(英文) Localization and function of tight junction protein in gingival junctional epithelium.

研究代表者

橋本 貞充 (Hashimoto, Sadamitsu)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10201708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：口腔上皮とエナメルを接着させ、高い細胞活性と細胞接着および細胞遊走能を持つ付着上皮細胞のバリア機能を検討するため、タイト結合構成タンパクと細胞骨格の構造、aquaglyceroporinの局在を免疫蛍光染色、免疫電顕、および超微構造学的に検討した。付着上皮細胞では、Occludin、ZO-1、Claudin-1、4、16が口腔上皮と比較して明らかに強く反応し、特にエナメル質側表層のDAT細胞で強い発現がみられ、付着上皮細胞は、歯肉結合組織側の基底細胞から付着上皮中央部にかけての細胞群と、DAT細胞に由来する付着上皮先端部およびエナメル質側表層細胞群との2つに分けられる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The junctional epithelium (JE) is located between the cemento-enamel junction and the epithelium of which connects consecutively to the gingival oral epithelium, forming the dento-epithelial junction. JE cells have highly potential of cell adhesion, cell migration and cell division. In this study, to clarify the barrier function of the JE cell, especially the cells directly attached to the tooth (DAT cells), we examined the expression patterns of tight junction protein family, tight junction associate protein, by immuno-fluorescence microscopically and electron microscopically. In the JE cells, especially cytoplasm of the DAT cells, strongly positive reaction of Occludin, ZO-1 and Claudin-1, 4, 16 were observed. It is suggested that, JE may be comprised of two part, such as gingival connective tissue side JE cells, and so called DAT cells including apical portion of JE.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：付着上皮 タイト結合 歯周組織 細胞接着 DAT細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯周組織は、正角化あるいは錯角化重層扁平上皮に被覆されるとともに、非角化上皮の付着上皮となってエナメル質表面と強固な接着を形成することにより、歯肉結合組織や歯根膜、歯槽骨、セメント質を含む、上皮下の内部組織を外部環境から保護している。この付着上皮は、形成初期には退縮エナメル上皮から移行するが、経時的に口腔上皮細胞の遊走によって常に新しい細胞に置き換わると考えられており、付着上皮とエナメル質の間は内側基板、歯肉結合組織との間は外側基板によって付着しており、付着上皮を介してエナメル質と歯肉結合組織とが強く結合されているのである。

この付着上皮の接着機構に関しては、我々の研究グループでは、DAT 細胞 (cells directly attached to the tooth) とよばれる最表層の付着上皮細胞が laminin<sub>2</sub> を分泌して内側基板を構成し、付着側の細胞表面に発現する integrin<sub>64</sub> により、エナメル質表面に強く接着してすると共に、integrin<sub>3</sub> を伸展側に発現して歯冠側へと移動する (Kinumatsu T. et al., Tsuchiya Y. et al. J.Periodont.Res., 2009) ことを示すと共に、正常の付着上皮はもちろんのこと、歯肉切除後の再生過程および長い付着上皮における laminin<sub>2</sub>、integrin<sub>4</sub>、integrin<sub>3</sub> の局在と発現を免疫蛍光染色の共焦点レーザー顕微鏡観察を行い、歯肉切除後の再生過程に形成される再生付着上皮、さらには、歯根露出後の歯根面に形成される長い付着上皮においても、正常な付着上皮と同様に、laminin<sub>2</sub>、integrin<sub>4</sub>、integrin<sub>3</sub> が、エナメル側の内側基板に局限して強く発現することを示し、付着上皮細胞の細胞接着と移動からなるターンオーバー機構を明らかにしてきた (Masaoka T. et al. J.Periodont.Res., 2009, Sugisawa M. et al. J.Periodont.Res., 2010)。

高い細胞活性と細胞接着および細胞遊走能を持つ付着上皮細胞からなる付着上皮のバリア機構と恒常性維持については、十分に明らかとはなっておらず、付着上皮の成長発育と加齢にともなう変化、歯周組織損傷後の再生付着上皮や歯周疾患罹患後の長い付着上皮におけるバリア機構の構築についてもあまり検討されていない。重層扁平上皮のバリア機構に関して、口腔粘膜上皮と由来を同じくする皮膚では、角化重層扁平上皮の顆粒層上部で細胞間隙が狭小となり、角化上皮細胞からの MCG(membrane coating granules)の放出により細胞間隙をセラミドなどの脂質でシールすることによって角質のバリアを構成するが、この領域の直下に顆粒細胞同士を密着させるタイト結合(Tight junction)によるバリア機構があり(Furuse M., Tsukita S. et al., J.Cell.Biol., 2002)、このバリア構成するタイト結合関連タンパク質の変調が種々の皮膚科的疾患の原因とも

なっているといわれている。

タイト結合構成タンパク質には、介在タンパクの ZO(zonula occludens)と、膜貫通タンパク質の Occludin および Claudin ファミリーがあり、分子の機能としての表層あるいは腺腔側膜と基底側方膜を分けるフェンス機構と、隣接する細胞膜を貫通して網目状に結合させ、外部環境から基底側の内部環境を分けるバリア機構をもっていることが知られている。しかしながら、口腔粘膜上皮や歯肉上皮では、生理学的透過性関門を構成する、これらのバリア機構に関連するタンパクの局在や機能は十分に検討されていない。特に付着上皮に関しては、口腔上皮と硬組織であるエナメルやセメント質と強固な接着を獲得しバリア機構を担わなくてはならない、というその特殊性故に、歯周組織防御の最前線であるにも関わらず、ほとんど明らかになっていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯周組織の恒常性維持に重要な役割を果たしている付着上皮のバリア機構の実態やその調節がどのように行なわれているかについて、歯肉の口腔上皮および付着上皮細胞におけるタイト結合関連タンパクや接着因子の発現、これらのバリア構造を裏打ちするアクチンフィラメント細胞骨格の構造、グリセロールを透過させて細胞間隙を閉鎖するアクアグリセロポリン役割、付着上皮細胞、特にエナメル側最表層の DAT 細胞 (cells directly attached to the tooth) の特徴と機能的役割などを解明することを目的として研究をおこなってきた。

研究項目としては、(1)タイト結合とアクチン細胞骨格の構造解析として、付着上皮および口腔粘膜上皮におけるタイト結合構成タンパク質の ZO、Occludin、Claudin、(2)水と低分子のグリセロールを選択的に透過させて重層扁平上皮の生理学的透過性関門機構を担うアクアグリセロポリンの凍結切片を用いた免疫蛍光染色による共焦点レーザーレーザー顕微鏡観察および凍結超薄切片を用いた免疫電顕観察、(3)ラット上顎臼歯部歯肉のフリーズフラクチャーレプリカ法による観察、(4)付着上皮細胞の最表層細胞・DAT 細胞 (cells directly attached to the tooth) の透過電子顕微鏡による微細構造の観察と、オスミウムマセレーション処理法による接着面および細胞骨格の低真空 SEM による立体構造の観察、を中心に行なった。

## 3. 研究の方法

(1)タイト結合とアクチン細胞骨格の構造解析のためには、SD 系雄ラットの口腔粘膜上皮および臼歯部歯肉付着上皮におけるタイト結合構成タンパク質の発現と局在を明らかにするために、ZO、Occludin、Claudin-1~16 を一次抗体とする免疫蛍光染色を行ない、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡

で観察した。

(2) アクアグリセロポリンの細胞局在解析のためには、SD系雄ラットの口腔粘膜上皮および臼歯部歯肉付着上皮を用いて、アクアグリセロポリンファミリー(AQP3およびAQP7)について、免疫蛍光染色を行ない、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察すると共に、4% Para formaldehyde と 0.2% Glutaraldehyde 固定後に sucrose に包埋した凍結超薄切片を用いた、金コロイド標識免疫電顕法により観察を行なった。

(3) SD ラット上顎臼歯部歯肉のフリーズフラクチャーレプリカ法による観察のためには、新鮮歯肉組織を用いた急速凍結ディープエッチング・フリーズフラクチャーレプリカ法および、グルタルアルデヒド固定組織を用いたフリーズフラクチャーレプリカ法により、タイト結合構成タンパク質と細胞膜直下のアクチン細胞骨格、サイトケラチン細胞骨格の超微構造の三次元解析を試みた。

(4) 付着上皮細胞の最表層細胞・DAT 細胞 (cells directly attached to the tooth) の透過電子顕微鏡による微細構造の観察のためには、SD ラット上顎臼歯部歯肉を Karnovsky 法により灌流固定後、通法に従い Epon 包埋して超薄切片を作製し透過型電顕で観察すると共に、オスミウムマセレーション処理法による接着面および細胞骨格の観察のためには、ラット臼歯部歯肉およびヒト抜去歯を用い、Karnovsky 法により固定後に、オスミウム酸を用いて細胞表面のマセレーション処理を行い、接着面および細胞骨格を低真空 SEM により立体構造を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) タイト結合関連蛋白の局在では、タイト結合の基本構成要素である Occludin と ZO が、口腔上皮の有棘層上部～顆粒層下部および歯肉溝上皮の表層部で付着上皮との境界面において、細い縮れた線状の網目構造として観察された。これは多角形の有棘細胞が非常に薄く圧縮され、細胞間隙が狭くなって積層する部に相当すると考えられ、広い面で積層した角化細胞の下部においてもタイト結合によって細胞の上面と下面とが明瞭に分けられ、極性を持って存在していることを示唆していた。一方、付着上皮細胞では、Occludin と ZO のみならず、Claudin-1、Claudin-4、Claudin-16 が口腔上皮と比較して明らかに強く反応し、特に DAT 細胞に相当するエナメル質側表層細胞で強い発現がみられた。詳細に観察すると、細胞膜直下に特に強く染色されて細胞の形態が明瞭になるものの、細胞質全体が均一に染まっており、口腔上皮で見られるような明らかな網目状のタイト結合の局在を示さなかった。このことから、付着上皮細胞でのこれらのタイト結合関連蛋白の産生は、付着上皮細胞の高い運動性や細胞接着能との関連が考えられた。

(2) グリセロールなどの分子を通過させるアクアグリセロポリンの AQP3、AQP7、AQP9 の細胞局在については、RT-PCR 法および Western Blotting 法では、AQP3 および AQP9 の遺伝子および蛋白の発現が認められたが、AQP7 についてはどちらも発現がみられなかった。AQP3 の蛍光標識は基底細胞の細胞質に強く認められ、有棘層から顆粒層あるいは表層への分化にともなって、細胞膜に局限するようになり、最表層の角質層では、反応が消失していた。一方、AQP9 の蛍光標識は AQP3 のものと比較して基底細胞および傍基底細胞の細胞質縁により強く認められた。免疫電顕像では、AQP3 の局在を示す金コロイド粒子は、基底層から有棘層では細胞膜下の細胞質に存在し、顆粒層上部や中間層上部では、細胞間隙に面する細胞膜上に局在しており、一方、AQP9 の金コロイド粒子は、基底細胞や有棘層では細胞膜下の細胞質や細胞膜に多くみられた。アクアグリセロポリンの AQP3 および AQP9 がラット口腔粘膜上皮の基底細胞から顆粒層上部あるいは中間層上部に存在することから、これらが上皮細胞間および細胞内を通過する浸透圧性の水の輸送・調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、生理学的透過性閥門の構築には AQP3 が関与すると共に、基底細胞からのグリセロールの取り込みには AQP9 が何らかの機能を果たしている可能性が示唆された。これらの結果は、Bull. Tokyo Det. Coll. 2014 Vol 55, p1-10 に掲載された。

(3) ラット上顎臼歯部歯肉の新鮮歯肉組織を用いた急速凍結ディープエッチング・フリーズフラクチャーレプリカ法および、グルタルアルデヒド固定組織を用いたフリーズフラクチャーレプリカ法によるタイト結合構成タンパク質と細胞膜直下のアクチン細胞骨格、サイトケラチン細胞骨格の超微構造の三次元解析については、現在進行中となっている。

(4) 付着上皮細胞の最表層細胞・DAT 細胞については、詳細な電子顕微鏡観察では、付着上皮先端部は DAT 細胞から構成されており、アクチン線維の豊富な DAT 細胞がエナメル側の内側基板と結合織側の外側基板とを繋ぐように存在しており、この DAT 細胞が付着上皮の性格を決めることが示唆された。また、ヒト抜去歯をオスミウム酸マセレーション処理による DAT 細胞の接着面および細胞骨格の SEM 観察では、接着面の細胞膜直下のケラチンフィラメントの走行と、細胞接着を裏打ちするアクチンフィラメントのネットワークが観察され、細胞の歯冠側への遊走を示唆していた。また、ラットにおいては細胞間隙が広く多数の好中球が遊走するが、ヒトの付着上皮では炎症がみられないかごく軽度の場合には、細胞間隙が狭く圧偏された細胞が積み重なり、細胞間隙が狭小となることが

示唆された。

このような結果からは、付着上皮細胞は、歯肉結合組織側の基底細胞から付着上皮中央部にかけての細胞群と、DAT 細胞に由来する付着上皮先端部およびエナメル質側表層細胞群との2つに分けられる可能性が示唆された事から、付着上皮の構成細胞と機能についてさらなる検討が必要であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Poveda M, Hashimoto S, Enokiya Y, Matsuki-Fukushima M, Sasaki H, Shimono M.: Expression and Localization of Aqua-glyceroporins AQP3 and AQP9 in Rat Oral Epithelia, Bull Tokyo Dent Coll. 2014; 55(1): 1-10.

橋本貞充: 歯肉の微細構造・機能・再生をみつめなおす. 歯界展望. 2014; 123(2): 271-279.

Matsuki-Fukushima, M., Hashimoto, S., Murakami, M., Ogata, Y., Fujita-Yoshigaki, J., Narita, T., Sugiyama, H.: The actin-specific reagent jasplakinolide induces apoptosis in primary rat parotid acinar cells., Arch Oral Biol., 57: 567-576, 2012.

〔学会発表〕(計 3 件)

橋本貞充, Gingival margin をみつめ直す・上皮機能を考える  
第 56 回・春季日本歯周病学会学術大会  
平成 25 年 5 月 31 日

橋本貞充, 特別講演「歯周組織の構造と防御機構を再考する」  
- マクロとミクロの視点からみる構造と機能・そして炎症から治療へ -  
大阪口腔インプラント研究会 第 110 回・例会・総会  
平成 25 年 5 月 19 日

橋本貞充, シンポジウム I ～歯肉のエイジング～「健康できれいな歯肉とは? 歯周組織の微細構造と防御機構」  
日本アンチエイジング歯科学会第 8 回学術大会  
平成 25 年 5 月 18 日

〔図書〕(計 件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本貞充 (Hashimoto Sadamitsu)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号: 10201708

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

村上政隆 (Murakami Masataka)

生理学研究所・細胞器官研究系・准教授

研究者番号: 10104275