

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592779

研究課題名(和文) 接合上皮内側基板制御因子の探索と特定

研究課題名(英文) Identification and characterization of internal basal lamina/tooth enamel adhesion

研究代表者

澤田 隆 (SAWADA, Takashi)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60125010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：内側基板によるエナメル質と接合上皮界面の緊密な結合の分子機構を解明する目的で、免疫組織細胞化学的に検索した。

その結果、接合上皮が歯冠側に移動しながらラミニン5を産生し、基板の恒常性を維持していることが示された。他方、基板のエナメル質側にはアメロチン蛋白で構成される微細突起が多数存在し、これが石灰化することにより、エナメル質と強固に結合していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to investigate the mechanism underlying adhesion between the internal basal lamina and the mineralized enamel surface. Immunogold labeling was performed to localize amelotin and laminin 5 at the tooth/junctional epithelium interface.

The results show that laminin 5 is actively synthesized in junctional epithelial cells and that the products are incorporated into the internal basal lamina to maintain firm epithelial adhesion to the tooth enamel throughout life. On the other hand, amelotin molecules were preferentially localized on the tiny strands associated with basal lamina, suggesting that the molecules facilitate cell/enamel adhesion by promoting mineralization of the strands.

研究分野：組織発生学

キーワード：歯肉 接合上皮 エナメル質 ラミニン アメロチン 免疫組織細胞化学 基底膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯肉接合上皮内側基板は歯(エナメル質)と歯肉の結合に重要であり、また歯周組織への外来異物の進入を阻止するための防波堤の役割も持っている。我々は以前、内側基板の微細構造について高分解能電子顕微鏡学的に解析し、内側基板が機械的強度を発揮するために特殊化した微細構造を有していることを示した。一方、内側基板の組成については多くの研究者による免疫組織化学的検索の結果、一般の基底膜にみられる型コラーゲンを欠如する代わりに、ラミニン5が豊富に存在していることが明らかとなっている。また、最近の研究では新しく発見された amelotin (AMTN) と odam (ODAM) が共に内側基板に局在することが明らかとなった。しかし、内側基板がエナメル質とどのような機構で結合しているのか未だ明らかとなっていない。

(2) 歯科臨床においてインプラント施術は広く行われており、今後さらなる増加が見込まれている。これに伴って、インプラント周囲炎によるインプラント体脱落症例数も近年増加傾向にある。その要因の一つに、インプラント体とインプラント周囲粘膜との接着が天然歯と歯肉接合上皮のそれと比較して十分でないかあるいは全く欠如している可能性が指摘されている。最近の我々が行ったラットの再植実験によると、再植歯と歯肉接合上皮との接着は早期に再生・回復し、これには再植歯面に残存している基底膜成分が有効であることを初めて明らかにした。この実験結果は、インプラント体界面にあらかじめ人為的に基底膜成分を介在させることにより、上皮性付着能の向上が図れることを提示するもので、その臨床応用が期待される。

(3) 接合上皮は発生学的には退縮エナメル上皮に由来し、歯の萌出後も暫く歯と歯肉の間に留まっている。接合上皮はその後、口腔粘膜上皮由来の細胞によって置換されるが、この細胞は初め外側基板(型コラーゲンなど多種類の基底膜成分)を産生し、その後、移動してエナメル質に接すると内側基板を産生するようになる。インプラント体周囲上皮も口腔粘膜上皮に由来するが、この場合は同細胞による基板の形成は抑制されている。このことから、上皮細胞による内側基板の形成には天然歯エナメル質の存在が強く影響するものと推測されるが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

天然歯と歯肉は接合上皮の内側基板を介して密に接着している。内側基板は他の一般的な基底膜と異なり、ラミニン5を主体に構成された特異な組成・構造を呈している

が、この特異性がどのようにして獲得され維持されているのか不明である。本研究の目的は、内側基板の特異性を制御している因子を探索・特定し、天然歯 歯肉接合上皮の接着機構の本態について解明する。

3. 研究の方法

(1) in situ hybridization 法: 6週齢の雄マウスを用いた。麻酔下にて下顎を採取後、直ちに浸漬固定を室温で約1時間施した。EDTAにて2週間脱灰を行った後、通法に従いパラフィンに包埋した。厚さ4μmの連続切片を作製し、in situ hybridization 染色に供した。用いたプローブはジゴキシゲニンで標識したRNAプローブである。

(2) 免疫組織細胞化学: 材料には、日本ザルの歯肉、および歯胚、さらに、ミニブタから得られた歯肉を材料に実験を施行した。動物は麻酔下にてそれぞれ、サンプリングを行い、浸漬固定を施した後、EDTA脱灰を行った。脱灰終了後、試料はオスミウム酸後固定し通法によりエポキシ樹脂に包埋した。試料の一部は後固定せず脱水、LR-White レジンに包埋した。ウルトラミクロトームにて厚さ70nmの超薄切片を作製し、ニッケルメッシュに載せた。切片を1%メタ過ヨウ素酸液で前処理し、次に非特異的反応を阻止するため1%ウシ血清中に浸漬した。1次抗体に4で一晩浸漬し、PBSで洗浄後、金コロイド標識二次抗体と反応させた。ウラン鉛二重染色を施し透過型電子顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) マウス歯肉接合上皮におけるラミニン5(2)、ラミニン10(5)、型コラーゲン(1)およびAMTNの発現について:

今回、歯肉接合上皮が標記した基底膜成分の産生にどのように関与しているか in situ hybridization 法を用いて検討した。その結果、ラミニン5の発現がエナメル質に接する接合上皮に認められた。その発現は、細胞がエナメル・セメント境から歯肉溝に向かって移動するにつれて強くなることが明らかとなった(図1)。この結果は、ラミニン5は接合上皮細胞の移動により活発に合成され、その産生物が内側基板に継続的に組み込まれることにより、エナメル質と歯肉の結合を強化していることが示唆された。AMTNは接合上皮には発現しないことが今回の実験で明らかとなった。一方、歯胚の成熟期エナメル芽細胞にはAMTNのmRNA発現が認められることから、免疫組織化学染色で内側基板に局在するAMTNは接合上皮が産生するのではなく、その大部分は成熟期エナメル芽細胞の産生物に由来することが示唆された。IV型コラーゲンおよびラミニン10の発現は接合

上皮に見られないことから、これらの成分の産生能は成獣マウス歯肉接合上皮では極めて低いことが想像された。

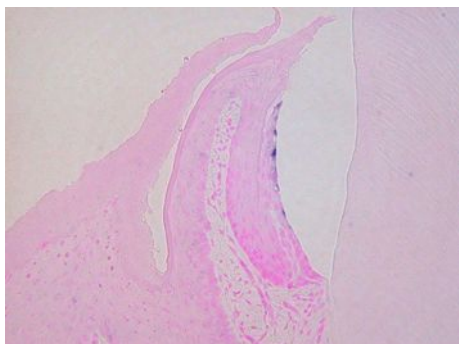


図1：マウス歯肉接合上皮における mRNA ラミニン5の発現

(2)サル歯肉接合上皮 エナメル質界面におけるラミニン5の発現に関する免疫電顕の検討：

ラミニン5は歯肉接合上皮 エナメル質界面に発現していることはよく知られているが、その微細構造レベルでの研究は少ない。今回、サル歯肉を用いてラミニン5の発現を酵素抗体法、金コロイド標識法により検索した。内側基板はセメント・エナメル境から

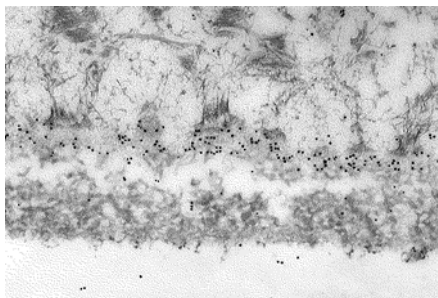


図2：サル歯肉接合上皮内側基板と歯小皮におけるラミニン5の局在

歯冠側に向かい厚みを増していた。酵素抗体法および金コロイド標識法(図2)を用いた免疫電顕による観察の結果、ラミニン5が内側基板の暗帯に一致して局在していることが示された。内側基板とエナメル質の間にはしばしば歯小皮が出現することが従来知られていた。しかしながら、この歯小皮の性状、あるいは由来に関しては諸説あるものの、その詳細についてはこれまで明らかにされていない。我々の以前の高分解能電顕の報告で、歯小皮は接合上皮の産生物に由来し、エナメル質と接合上皮の界面に沈着したものであることを指摘した。

今回の研究から、ラミニン5を認識する金コロイド粒子が歯冠側の内側基板直下に出現した歯小皮にも分布することが明らかとなった(図2)。この結果は、少なくとも歯小皮には基底膜成分であるラミニン5が存在しており、これの産生には接合上皮、特

にエナメル質に面した細胞が関与することが示唆された。今回の結果は先に示した研究成果(1)のmRNAラミニン5の所見(図1参照)により支持される。

(3)成熟期エナメル芽細胞 エナメル質界面におけるアメロチン蛋白(AMTN)の局在について：

エナメル質蛋白としては、アメロジェニン、エナメルリン、アメロプラスチンなどが知られている。最近、AMTNそしてODAMが新たに発見され、その機能についてエナメル質研究者の注目を集めている。そこで、今回AMTNに対する特異抗体を用いて、サル歯肉成熟期のエナメル芽細胞とエナメル質界面におけるAMTNの微細局在について検討した。

成熟期エナメル芽細胞は基底膜様構造を介してエナメル質表面と強く結合することが知られている。しかしながらその接着機構の詳細はほとんど解っていない。我々は以前の研究で、この基底膜様構造は厚みの一定な基板とそのエナメル質側に発達した線維層で構築されていること、さらにこの線維層が石灰化することにより、エナメル質との強固な結合を可能にしていることを示した。今回のAMTNを用いた免疫電顕観察により、この成熟期基底膜線維層にAMTNが局在していることが初めて明らかとなった(図3)。一方、基板にはラミニン5は局在しているが、AMTNの局在は認められなかった。以上より、AMTNはエナメル質の基質を構成するタンパクとしてではなく、成熟期基底膜に特異的な線維層を構成する分子の一つであることが示唆された。さらにこの分子が石灰化を促進することにより、線維層の石灰化を促してエナメル質結晶と一体化することにより界面の結合に寄与していることが示された。

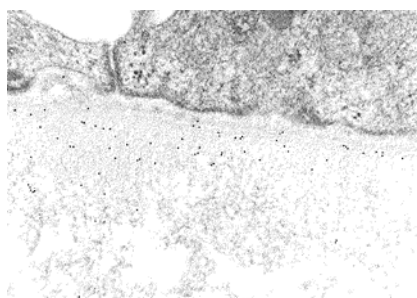


図3：サル歯肉成熟期エナメル芽細胞の基底膜様構造に付随する線維層とAMTNタンパクの局在

(4)形成中の接合上皮における内側基板とエナメル質界面の接着機構に関する考察：

現在、ミニブタの萌出中の歯を用い、基板/エナメル質界面におけるAMTNの局在を検索している。その結果、この界面も先に報告した成熟期エナメル芽細胞で明らかとなった接着機構と同じ方法でAMTNが接着に中心

的役割を演じていることが明らかになりつつある。これら一連の研究成果は、エナメル質/接合上皮界面の接着機構を解明する有力な手掛かりを与えるもので、今後、臨床分野での歯肉の恒常性を維持する基盤データとなると考える。

引用文献

Sawada T, Inoue S, Mineralization of basement membrane mediates dentogingival adhesion in mammalian and nonmammalian vertebrate. *Calcif Tissue Int*, 73, 186-195, 2003

Sawada T, Inoue S, High resolution ultrastructural reevaluation of dental cuticle in monkey tooth, *J Periodontal Res*, 36, 101-107, 2001

Hormia M et al., The epithelium-tooth interface - a basal lamina rich in laminin-5 and lacking other known laminin isoforms, *J Dent Res*, 77, 1479-1485, 1998

Moffatt et al., Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium, *Biochem J*, 399, 37-46, 2006

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)

Sawada T, Ultrastructural and immunocytochemical characterization of ameloblast-enamel adhesion at maturation stage in amelogenesis in *Macaca fuscata* tooth germ, 査読有, 144, 2015, 587-596
DOI: 10.1007/s00418-015-1362-y

Sawada T, Yamazaki T, Shibayama K, Yamaguchi Y, Ohshima M, Ultrastructural immunolocalization of laminin 332(laminin5) at dento-gingival interface in *Macaca fuscata* monkey, *Medical Molecular Morphology*, 査読有, 48, 2015, 104-111,
DOI: 10.1007/s00795-014-0085-9

Sawada T, Yamazaki T, Shibayama K, Kumazawa K, Yamaguchi Y, Ohshima M, Expression and localization of laminin 5, laminin 10, type IV collagen, and amelotin in adult murine gingiva, 査読有, *J Mol Hist*, 45, 2014, 293-302
DOI: 10.1007/s10735-013-9559-7

[学会発表](計2件)

Sawada T, Ultrastructural localization

of laminin 5 at dentogingival border, The Microscopy Conference 2013, 2013年8月25~30日, Regensburg (Germany)

澤田 隆, ニホンザル歯 歯肉接合上皮におけるラミニン5の超微局在, 第54回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2013年9月27, 28日, 航空会館(東京都・新橋)

[図書](計1件)

Sawada T他, FORMATEX, Current microscopy contributions to advances in science and technology, 2012, 422-428

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 隆 (SAWADA, Takashi)
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 60125010

(2) 研究分担者

柴山 和子 (SHIBAYAMA, Kazuko)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 60408317

(3) 連携研究者

()

研究者番号: