

平成 27 年 9 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390408

研究課題名(和文) エナメル質成熟化の新パラダイム：エンドサイトーシスに拠らない蛋白脱却機構の証明

研究課題名(英文) New paradigm of enamel maturation: Mechanisms of non-endocytotic resorption and degradation of enamel matrix proteins

研究代表者

高野 吉郎 (Takano, Yoshiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90126425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル質が高度な石灰化組織となるためには、幼弱エナメル質に含まれる大量の有機成分を取り除き、結晶成長のための空間を確保する必要がある。

本研究で我々は、エナメル質の有機性基質の分解と脱却経路を明らかにすることを目的に、ラットとヒト歯胚を形態学的手法で検索し、トームス突起と波状縁に有機アニオン輸送体(OAT)が備わっていること、エナメル芽細胞はそのOATを介して基質の断片をサイトゾルへ送り込み、ユビキチン・プロテアソーム系で消化する能力を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Massive removal of organic matrix components from immature enamel is essential for the induction of large apatite crystals and ultimately high mineralization of the unique dental tissue of epithelial origin.

Amelogenesis is characterized by degradation and re-absorption of enamel matrix proteins in both secretory and maturation stages of amelogenesis but how exactly the ameloblasts remove organic constituents is not well documented. Current study confirmed existence of organic anion transporters (OATs) in the Tomes' process and ruffled border membranes of ameloblasts and that ameloblasts transport the cleavage product of enamel matrix proteins via OATs to the cytosol for final processing through the ubiquitin-proteasome system.

研究分野：形態系基礎歯科学

キーワード：enamel matrix amelogenin proteasome ubiquitin endocytosis ameloblast

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの低成熟型エナメル質形成不全症の多くは、エナメルタンパク分解酵素をコードする遺伝子の点変異に起因する基質の脱却不全による。この事実はエナメル質が高度な石灰化を獲得するためには、成熟の過程でエナメル質から有機性基質が効率よく脱却されることが重要であることを意味するが、その仕組みの詳細については未解明の点が多く残されていた。

(2) エナメル質は基質形成期と成熟期の二段階で形成され、完成時には密に配列する大型のハイドロキシアパタイト結晶で占められる、生体で最も高度な石灰化組織となる。基質形成期の幼若エナメル質中に存在するエナメルタンパク質の主要成分であるアモロゲニンは、同じくエナメル芽細胞から分泌されるタンパク分解酵素(MMP20)によって、分泌直後から C-末端部が選択的に切断され、低分子化することが生化学的に証明されている。アモロゲニンの断片化は基質形成期を通してその後も進行するが、成熟期に入ると、エナメル芽細胞が新たに分泌する別種のタンパク分解酵素(EMSP1)によって、基質の断片化は一層加速する。結果として、エナメル質の有機性基質の大部分は成熟期の比較的早い段階で高度に断片化され、恐らく可溶化した状態で脱却されるものと考えられている(図1)。しかし、基質の分解産物が具体的にどのような経路でエナメル質から除去され、最終的にどの細胞でどのように処理されるかについては未だ推測の域を出ず、明らかな回答は得られていない。

(3) 我々はこれまで、エナメル質形成過程における有機性基質の動態とミネラルの輸送機構、それらに伴う局所 pH の変動の仕組みとその意義を明らかにすることを目的に、長年に渡り検討と続けてきたが、その過程で、活発なイオン輸送と生体異物の排泄を司る腎尿細管上皮と、歯胚のエナメル上皮の間に、

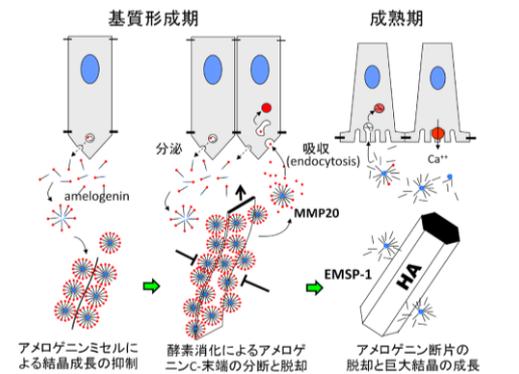


図1 アモロゲニン(AM)の動態：既存概念
基質形成期：AMは分泌直後にミセル化→AMのミセルがリボン状幼若アパタイト結晶に吸着し結晶成長を抑制→MMP20によるAMのC-末切断とエナメル芽細胞による断片の吸収(エンドサイトーシス)→ミセルの吸着と解離の平衡状態の維持 =結晶成長抑制の持続
成熟期：EMSP1によるAMの小断片化→結晶成長抑制の解除→成熟期エナメル芽細胞によるAM断片の吸収(エンドサイトーシス)→エンドゾーム、リソゾーム系による最終消化

輸送上皮としての多くの共通点があることを認め、両者の比較を通してエナメル質形成機構、特にエナメル質成熟機構の本態解明に向けたアプローチを展開してきた。

2. 研究の目的

こうした背景を基に、我々はエナメル質の巨大アパタイト結晶の誘導を可能にするエナメル質有機性基質の分解と脱却の仕組み、およびそれに関わるエナメル芽細胞の周期的形態変化の機能的意義を明らかにすることを目的に本研究計画を策定し、ラットとヒトの歯胚で以下の検討を試みた。

- (1) エナメルタンパクの局在パターンの精査
- (2) エナメル芽細胞層におけるユビキチンとプロテアゾームの局在
- (3) プロテアゾーム阻害剤がアモロゲニンの局在に及ぼす影響
- (4) エナメル芽細胞層における有機アニオン輸送体 (organic anion transporters) の免疫局在
- (5) エナメル質形成過程における有機アニオンの動態

3. 研究の方法

(1) 組織標本の調整

体重 40~50g ないし 100g の雄性 Wistar ラットを、イソフルラン吸引麻酔下で左心室より 4%緩衝ホルマリンで灌流固定し、顎骨とともに上顎切歯を摘出して、10%中性 EDTA で脱灰した。脱灰試料は脱水後、パラフィンまたは水溶性樹脂 (Technovit 7100) に包埋し、5 μm ないし 2 μm を、一般組織染色と免疫染色に供した。一部のラットは、corn 油に溶解した proteasome 阻害剤 (MG132, Sigma: 3.8mg/Kg) を 3 日間、1 日あたり 2 回注射した後に同様に灌流固定し、脱灰後、パラフィン包埋して免疫染色に供した。

ヒト歯胚の観察には、ペラデニア大学歯学部より供与されたヒト胎児歯胚のパラフィン包埋ブロック (ペラデニア大学付属病院倫理審査委員会承認試料) を用い、7 μm 切片を作製して組織観察と免疫染色に供した。

(2) 免疫染色

脱パラフィンした切片を、Tris-EDTA buffer (pH 9.0) で 60°C~98°C, 20 分間加熱処理し、抗原賦活した後に免疫染色 (immunofluorescence) に供した。一次抗体は Rb 抗ウシ 25kD amelogenin 抗体、Rb 抗ウシ ameloblastin 抗体 (ともに広島大内田 隆教授より供与)、抗ウシ ubiquitin 抗体 (mono) (MBL)、Rb 抗ヒト proteasome 抗体 (Epitomics)、Rb 抗ラット OAT1 抗体、同 OAT2 抗体 (Alphadiagnostics)、Rb 抗 rat OAT3 抗体、同抗ヒト OAT2 抗体、同ヒト OAT3 抗体 (Transgenic) を用いた。蛍光標識二次抗体で処理した後に DAPI で核染色し、蛍光顕微鏡観察、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) in vivo 有機アニオントレーサー実験

有機アニオン (organic anion) の性質を持つ蛍光物質 Lucifer Yellow CH (LY) (Molecular Probes) を有機アニオントレーサーとして用いた。

体重約 50g の雄性 Wistar ラットの右頸部静

脈に、吸引麻酔下での LY 0.5% 水溶液を 1ml/100g BW 注射し、5 分~60 分後に 4%緩衝ホルマリンで灌流固定し、上下顎を摘出して暗所にて EDTA 脱灰後、Technovit 7100 に包埋した。4 μm 厚の切歯を作製し、DAPI で核染色して蛍光顕微鏡観察に供した。

4. 研究成果

(1) エナメルタンパクの局在の精査

通常、パラフィン切片では、基質形成期のエナメル質はアメロゲニンの免疫反応が検出されにくい。Tris-EGTA buffer で抗原賦活すると染色性が著しく高まる。エナメル芽細胞層の免疫反応性も有意に高まり、基質形成期全域で、エナメル芽細胞のゴルジ装置に一致して明瞭な陽性反応を認めるようになる。形成期早期のエナメル芽細胞では、ゴルジ装置以外に特記すべき反応は無いが、形成期中期から後期には、サイトゾルに拡散性にアメロゲニン陽性反応を示す細胞が出現する。陽性細胞は形成期終盤に数を増し、移行期に一端消失して、成熟期に再び出現する。成熟期の早期には大部分のエナメル芽細胞がサイトゾルにある程度の陽性反応を示すようになる。サイトゾル以外には陽性反応はリソゾームに限局しており、ゴルジ装置には殆ど認められない (図 2)。

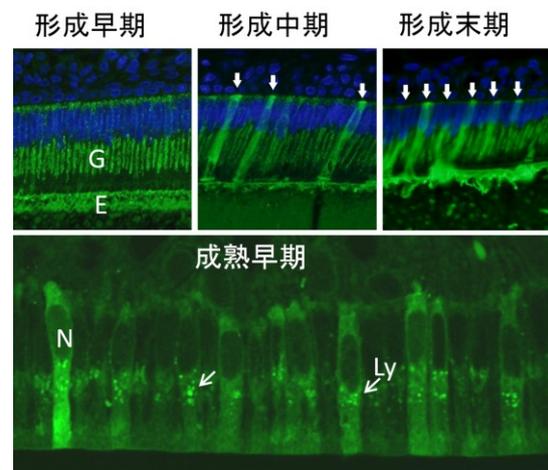


図 2 エナメル芽細胞のアメロゲニン陽性反応
上段矢印はサイトゾルに陽性を示すエナメル芽細胞を示す。成熟期早期のエナメル芽細胞は大部分がサイトゾルに陽性反応を示す。 G ゴルジ装置、E エナメル質、N 核、Ly リソゾーム

一方でアメロブラスチンの免疫反応は、同様な条件で染色しても、基質形成期、成熟期ともにゴルジ装置が陽性を示すのみで、サイトゾルは陰性であること（図3）から、エナメル芽細胞のサイトゾルに見られたアメロゲニンの拡散性反応が、エナメル芽細胞の変性や固定不良等による人口産物でないことは明らかである。

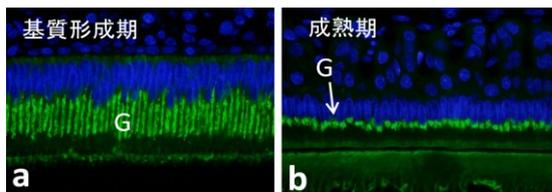


図3 アメロブラスチンの免疫反応
基質形成期(a)、成熟期(b)を通じて陽性反応はゴルジ装置(G)に限局しており、細胞質に拡散性の反応は見られない。

(2) ユビキチンとプロテアゾーム

エナメル芽細胞のサイトゾルに見られたアメロゲニンの陽性反応は、粗面小胞体の品質管理の一環として、不完全な合成産物が小胞体から汲みだされたか、あるいは基質の分解産物が何らかの経路で細胞膜を通過し、サイトゾルへ移動したものである可能性がある。いずれにしても図2の事実は、エナメル芽細胞のサイトゾルで、エンドゾーム、リソゾーム以外のタンパク分解システムが稼働していることを示している。図4は今回エナメル芽細胞層に確認された、ユビキチンとプロテアゾームの免疫反応の局在性を模式的に示したもので、基質形成期エナメル芽細胞にユビキチンとプロテアゾームが共存すること、一方で、成熟期エナメル芽細胞は、RAの時期にユビキチンが発現し、SAではプロテアゾームが発現していることを表している。サイトゾルのアメロゲニンの免疫反応が、エナメル質から脱却された基質の断片と過程すると、エナメル芽細胞はRAの時期にサイトゾルに取り込まれたアメロゲニンの断片をユビキチン化し、SAに変化した際にプロテアゾームで分解していることになる。いずれ

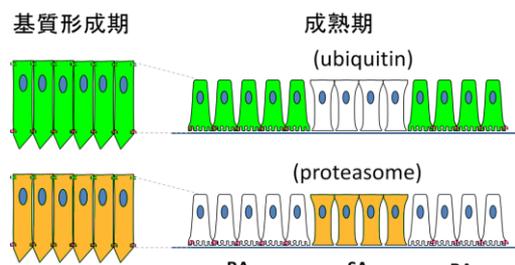


図4 エナメル芽細胞層におけるユビキチン（上段）とプロテアゾームの局在

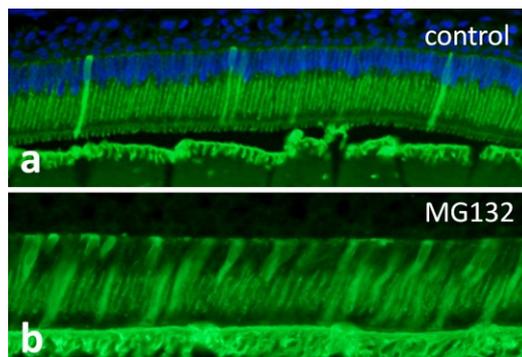


図5 形成期中期のエナメル芽細胞層におけるアメロゲニン免疫反応

- 無処置コントロール: サイトゾルが陽性の細胞は少数
- プロテアゾーム阻害剤3日投与群: 陽性細胞が明らかに増加している

にしても、この染色結果は、基質形成期、成熟期を通じて、エナメル芽細胞にエンドサイトーシスに依らない基質断片の吸収・処理機構が備わっている可能性を強く示唆する。

(3) プロテアゾーム阻害剤の影響

プロテアゾーム阻害剤 MG132 を3日間投与したラットでは、サイトゾルがアメロゲニン陽性のエナメル芽細胞数が大幅に増加した（図5）。この現象は、生理的条件下では、多くのエナメル芽細胞は、ユビキチン・プロテアゾーム系におけるサイトゾル消化系が高効率に働いているため、サイトゾルへのアメロゲニン断片の流入は恒常的にあるものの、免疫反応で捉えられるレベルの量が貯留しないことを示している可能性がある。別の見方をすれば、基質形成期後半に見られるサイトゾルの反応はエナメル芽細胞のサイトゾル消化系の効率の低下を反映し、成熟期早期のエナメル芽細胞のサイトゾルの反応は、膨

大量の分解産物がサイトゾルに流入していることを示している可能性がある。

(4) エナメル芽細胞層の有機アニオン輸送体 organic anion transporters (OATs)

OAT は腎尿細管における生体異物の排泄に機能する膜タンパク質で、OAT1～OAT5 までのサブタイプが存在し、腎以外にも肝臓や脳での物質輸送にも関わっていることが知られている。アメロゲニンは分泌直後から C-末端が酵素的に分断されることは既に述べたが、c-末断片が有機アニオンと見做される点は注目に値する。我々はエナメル芽細胞のサイトゾルに見られたアメロゲニンの免疫反応が、OAT を介した基質断片のサイトゾルへの輸送の結果を反映するものと捉え、エナメル芽細胞層における OAT の局在を検討した。その結果、ラットとヒトの歯胚で、基質形成期エナメル芽細胞のトームス突起の膜に沿って OAT2 が局在すること、ラットの観察では OAT2 は移行期で消失し、成熟期になると、RA の波状縁に OAT1 が発現すること、更に中間層細胞に OAT3 が局在していることを明らかにした (図 5 a)。

OAT の輸送は基本的に両方向性といわれ、エナメル芽細胞における OAT の輸送方向は現状では不明であるが、形成期エナメル芽細胞のトームス突起を介してアメロゲニンの C-末断片が吸収され、成熟期では RA の波状縁を介して大量の分解産物が吸収される、とする従来の見解と矛盾しない。

(5) 蛍光トレーサー Lucifer Yellow (LY) を用いた有機アニオンの動態解析

蛍光性有機アニオン Lucifer Yellow (LY) は OAT の存在しない細胞膜を通過しないため、OAT の存在下で緑色蛍光を発する細胞は、OAT を持つ細胞か、細胞膜が損傷した細胞のいずれかである。

LY を血中投与すると、直ちに腎の尿細管上皮のサイトゾルが強い蛍光を発し、サイトゾルを介した LY の尿中への排泄の様子を見ることができる。今回、LY を静脈注射したラッ

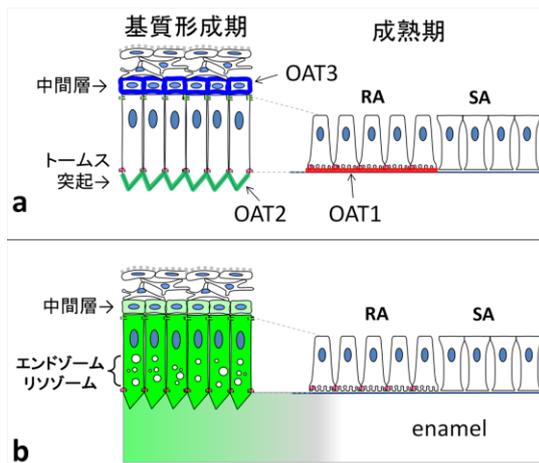


図6 OAT の局在(a)と in vivo 蛍光有機アニオントレーサー実験における Lucifer Yellow の局在を示す模式図(b)

トのエナメル器を観察したところ、基質形成期のエナメル芽細胞と中間層細胞のサイトゾルだけが LY で標識されることがわかった (図 6)。幼若エナメル質も LY で強く標識されたことから、エナメル芽細胞のサイトゾルの標識は、LY がエナメル芽細胞の細胞間隙を通過してエナメル質に達し、トームス突起の OAT2 を介して二次的にサイトゾルに達したものと推定された。波状縁に OAT1 を持つ RA は、LY が RA 間の固い細胞間結合を通過できないため標識されなかったものと思われる。

以上、本研究によって、エナメル質の有機性基質の脱却に、エンドサイトーシスに依らないサイトゾル分解系が関与していること、成熟期エナメル芽細胞の周期的形態変化が、サイトゾル分解系の効率化に寄与していることが示唆された。

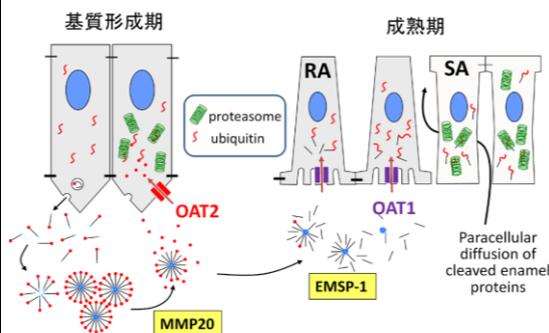


図7 本研究で得られた成果に基づく有機性エナメル基質脱却機構の新規概念図。エンドサイトーシス経路は省略した

5. 主な発表論文等

[雑誌論文 1](計8件)

- ① Guo J, Lyaru D.M, Takano Y, Gibson CW, DenBesten PK, and Broncker AL: Amelogenins as potential buffer during secretory stage amelogenesis, J Dent Res. 査読有 94 巻:412-420, 2015. doi: 10.1177/0022034514564186
- ② Kazuhiro Takeyama, Masahiro Chatani, Yoshiro Takano, Akira Kudo: In-vivo imaging of the fracture healing in medaka revealed two types of osteoclasts before and after the callus formation by osteoblasts. Dev Biol. 査読有 2014,394 巻:292-304. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.08.007
- ③ Dawud Abduweli, Otto Baba, Makoto J Tabata, Kazunori Higuchi, Kiyoshi Mitani, Yoshiro Takano: Tooth replacement and putative odontogenic stem cell niches in pharyngeal dentition of medaka (*Oryzias Latipes*), Microscopy (Oxf). 査読有 63 巻: 141-153, 2014. doi: 10.1093/jmicro/dft085
- ④ Chen, Chunlin; Wang, Zhongchang; Saito, Mitsuhiro; Tohei, Tetsuya; Takano, Yoshiro; Ikuhara, Yuichi: Fluorine in Shark Teeth: Its Direct Atomic-Resolution Imaging and Strengthening Function. Angewandte Chemie, 査読有 126 巻:1569-1573, 2014, DOI: 10.1002/anie.201307689
- ⑤ Helle Damkier; Kaj Josephsen; Yoshiro Takano; Dirk Zahn; Ole Fejerskov; Sebastian Frische: Fluctuations in surface pH of maturing rat incisor enamel are a result of cycles of H⁺ secretion by ameloblasts and variations in enamel buffer characteristics, Bone. 査読有 60 巻: 227-234, 2014, doi: 10.1016/j.bone.2013.12.018
- ⑥ Otto Baba. Masato S Ota, Tatsuo Terashima, Makoto J Tabata, Yoshiro Takano: Expression of transcripts for fibroblast growth factor 18 and its possible receptors during postnatal dentin formation in rat molars. Odontology. 査読有 2013 Dec 28. DOI 10.1007/s10266-013-0147-9
- ⑦ Chisa Shitano, Otto Baba, Sawa Kaneko, Jun Hosomichi, Yasuhiro Shimizu, Naoki Shibutani,; Risa Usumi-Fujita, Yoshiro Takano, Takashi Ono: Alveolar bone loss induced by the orthodontic tooth movement under hypofunctional conditions in rats. Orthodontic Waves 査読有 2013; 72 巻:148-155. DOI

10.1016/j.odw.2013.07.002

- ⑧ Ratnayake A.R.K. Ratnayake, Dawud Abduweli, Seong-Suk Jue, Otto Baba, Makoto J Tabata, Kaj Josephsen, Ole Fejerskov, Yoshiro Takano: Organic Anion Transport in during Rat Enamel Formation. J Oral Biosci (2013) 55: 40-46.

[学会発表] (計31件)

- ① 高野吉郎 他2名: エナメル芽細胞のサイトゾルにおけるエナメルタンパク処理機構, 日本顕微鏡学会第70回学術大会、2014年5月11-13日、幕張メッセ国際会議場、
- ② Yoshiro Takano 他4名: Co-Localization of Amelogenin and Ubiquitin/Proteasome in the Cytosol of Ameloblasts. 91st IADR/AADR General Session, March 20-23, 2013, Seattle, USA,.
- ③ Yoshiro Takano,他1名: Propagating Waves of Ameloblast Modulation Affect Enamel pH, Mineral Acquisition, and Crystal Growth in Maturing Enamel. 日本顕微鏡学会第57回シンポジウム、2013年11月15日~16日、愛知県産業労働センター、名古屋市
- ④ 高野吉郎:エナメル質成熟に伴う巨大アパタイト結晶誘導機構解明への微細構造学的アプローチ, 日本顕微鏡学会第68回学術講演会 2012年5月14-16日、つくば市国際会議場
- ⑤ R.A.R.K. Ratnayake 他2名: Organic Anion Transporters in Rat Enamel Formation, 第100回日本解剖学会関東支部学術集会、2012年10月13日、東邦大学医学部・大田区

6. 研究組織

(1)研究代表者

高野 吉郎 (TAKANO Yoshiro)
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号:90126425

(2)研究分担者

田畑 純 (TABATA J Makoto)
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号:20243248

(3)研究協力者

井関 八郎 (ISEKI Hachiro)