

平成 21 年 5 月 17 日現在

研究種目:若手研究(B)
 研究期間:2007年~2008年
 課題番号:19791569
 研究課題名(和文) 膜蛋白異常症をもたらす遺伝子・タンパク質を指標にしたエナメル質形成機構

研究課題名(英文) localization of ion channel disease related genes and proteins in amelogenesis

研究代表者

河野 承子 (KAWANO SHOKO)
 新潟大学・医歯学総合病院・助教
 研究者番号:10397127

研究成果の概要:

膜輸送タンパク異常症は、異常膜輸送タンパクに起因する膜輸送障害によって惹起される疾患で、主たる膜輸送タンパク質はチャンネルと輸送体(トランスポータ)である。この膜輸送タンパク異常症をもたらす遺伝子・タンパク質に関連して、アクアポリン1、アミロライド感受性上皮性ナトリウムイオンチャンネル、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ の遺伝子発現、タンパク質局在について検索した。歯牙組織には発生時期、細胞成分ごとに、これらの遺伝子発現およびタンパク発現が見られることを明らかにした。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:歯学・小児歯科学

キーワード:免疫組織化学 微細局在 イオン輸送

1. 研究開始当初の背景

歯牙組織における2種のステロイドホルモン受容体の特異的発現により、歯牙組織がステロイドホルモンの標的器官であることを明らかにした。その後グルココルチコイドによって制御される Na-K ATPase (ポンプ)のエナメル器における経時的発現を明らかにした。

これら歯の硬組織形成過程において、エナメル芽細胞における膜輸送タンパクの発現、変化をもとに膜輸送タンパク異常症の原因遺

伝子・タンパクの役割が重要であると考えた。

2. 研究の目的

歯牙発生における膜輸送タンパクの局在を明らかにすることによってその役割、ひいては歯牙形成不全症の病因についての知見を得る。

3. 研究の方法

RT-PCR法およびリアルタイムPCR法による遺伝子発現検索
 免疫組織化学によるタンパク局在検索

in situ hybridization 法による組織学的遺伝子発現検索

電子顕微鏡による微細構造学的な局在検索

4. 研究成果

1. 歯牙硬組織形成における Na^+K^+ -ATPase の発現とその存在意義。

歯牙硬組織形成過程の歯性細胞、特に、エナメル器、乳頭層細胞における Na^+K^+ -ATPase の発現を免疫組織学的、微細構造学的に検討する。特に、乳頭層細胞での形態学的な変化と、エナメル芽細胞のモジュレーションに対応した、 Na^+K^+ -ATPase アルファサブユニットの発現の変化に焦点を当て、エナメル質形成過程での体液輸送、イオン輸送における Na^+K^+ -ATPase の存在意義を明らかにした。歯の硬組織形成過程では、各発生段階に特異的なタンパク合成、分泌、吸収、イオン輸送、石灰化に関連する機能変化、形態変異が時空間的に起こっている。特に、エナメル芽細胞はその分化過程で、同一の細胞が分泌性上皮から、吸収性上皮へ、さらには石灰化物形成上皮へと変化し、また、エナメル器を構成する中間層細胞、乳頭層細胞などの細胞は、エナメル基質、各種のイオン、水分、無機イオン輸送に積極的な役割を果たしていると考えられている。一般的に、 ENaC は極性を持った上皮細胞のアピカルメンブレンに局在し、密着上皮を介する Na イオン輸送に関与している。一方、細胞膜を介する電気化学的 Na イオン濃度勾配によって細胞内に進入する Na イオンは、そのバゾラテラル側に局在する Na^+K^+ -ATPase によって結合組織中にくみ出されていると考えられている。エナメル器乳頭層細胞は細胞質突起が絡み合った細胞間チャンネルを形成する細胞で、この細胞層内には、有窓毛細血管を抱き込んでおり、この形態学的特徴は活発な物質輸送の存在を示している。これまでの研究では、エナメル器における Na^+K^+ -ATPase の発現は、エナメル芽細胞ラテラル側細胞膜と乳頭層細胞の細胞質突起にみられることが報告されている。しかしながら、これらの報告は古典的な組織細胞化学的手法を用いたもので、主にエナメル芽細胞の観察に主眼が置かれ、エナメル器全体としての Na^+K^+ -ATPase の発現の局在は明らかにされていない。また、特に、我々が注目する、機能的分泌腺としてのエナメル器細胞群の形態変化に対応させたものではなかった。本研究では、 Na^+K^+ -ATPase の局在を、エナメル質分泌形成における、細胞群の形態変化と Na^+K^+ -ATPase 発現の変化について、免疫組織学的、微細形態学的に検討し上図のような所見を得、エナメル質形成過程の体液輸送、イオン輸送における Na^+K^+ -ATPase の存在意義を明らかにした。

2. 歯牙組織におけるカルサイクリン (S100A6) の発現とその存在意義。

細胞内の多様なプロセスを制御しているカルシウムイオンの作用は、カルシウム結合タンパクを介して実行される。カルモデュリンおよび S100 タンパクは EF-ハンドカルシウム結合モチーフを持つスーパーファミリータンパクで、カルモデュリンが全身に普遍的に存在しているのに対し、

S100 タンパクは組織ごとに異なったファミリーメンバーが分布し、組織特異的な作用を担っていると考えられている。

S100 蛋白は、低分子量のカルシウム結合性蛋白であり、細胞の分化、増殖などへの関与が示唆されている。また組織ごとに異なるファミリーメンバーが分布し、組織特異的な役割を担っている。現在まで 16 あまりの S100 分子が同定されているが、S100 ファミリーは α 、 β の 2 つのサブユニットからなる二量体構造をとり、 α 鎖 β 鎖から成る S100A と β 鎖 β 鎖から成る S100B とに大きく大別され、100B は主に神経組織、軟骨、脂肪組織に多く含まれ、S100A は骨格筋や腎臓に多いとされている。そのうち S100A6 はカルサイクリン (分子量: 10.5kDa, S100A に属する) と呼ばれており、細胞の増殖サイクルに関与し、急性骨髄性白血病や肺腺癌、大腸癌などの悪性腫瘍細胞に特異的に過剰発現することなどから、悪性腫瘍マーカーとしても用いられているが、その生物学的作用についてはまだ十分には解明されていない。また、歯牙組織における発現に関しては、全く報告されていない。

歯の硬組織形成過程では、各発生段階に特異的なタンパク合成、分泌、吸収、イオン輸送、石灰化に関連する機能変化、形態変異が時空間的に起り、エナメル器を構成する内エナメル上皮はエナメル芽細胞に、歯乳頭細胞、歯小囊細胞は、それぞれ、歯髓細胞、象牙芽細胞、および、歯根膜細胞、セメント芽細胞に分化する。既に、予備実験で形成完了後の切歯に、カルサイクリンが発現していることを確認しているため、本研究では、カルサイクリンが歯牙発生過程に経時的にどの細胞成分にどのようなパターンで発現するのかに着目して、歯牙発生におけるカルサイクリンの役割を明らかにしようとした。

生後 1 日齢では、前エナメル芽細胞に中等度の陽性反応が観察された、生後 3 日では、エナメルフリーエリアエナメル芽細胞に強い免疫陽性反応が観察された。生後 6 日では、エナメルフリーエリアエナメル芽細胞に強い免疫反応が、また、分化した咬頭頂部象牙芽細胞にも免疫陽性反応が見られるようになった。しかしながら、基質形成期エナメル芽細胞には、免疫陽性反応は見られなかった。生後 15 日では、成熟期エナメル芽細胞に強い免疫陽性反応が見られるようになった。18 日齢、退縮期エナメル芽細胞では免疫陽性反応は減弱し、最終的には退縮エナメル上皮の免疫反応は消失した。またこの時期、歯根表面のセメント芽細胞にも免疫陽性反応が見られた。カルサイクリンはエナメル質の形成のみならず、象牙質、セメント質の形成にも関与することが示唆された。更に、基質形成期前と、成熟期においては、発現様式と発現強度が大きく異なることより、カルサイクリンはエナメル芽細胞において、全く異質の役割を果たしている可能性が示唆された。前エナメル芽細胞では細胞の分化に関与していると考えられるが、エナメルフリーエリアに早期に強い陽性反応が見られたことや、また、象牙芽細胞、セメント芽細胞にも陽性反応が見られたことから、成熟期エナメル芽細胞に発現しているカルサイクリンはエナメル質の成熟と

は全く関連のない可能性も示唆された。

3. 歯牙発生過程におけるアクアポリン 1 (AQP1) の発現とその存在意義

アクアポリンは植物から動物まで生物界に広く分布する膜タンパクで、腎臓や汗腺などの細胞の本来疎水性である細胞膜を介する水の輸送に関与する。近年の研究では、アクアポリンファミリータンパクは皮膚、脂肪細胞などの液体輸送に関与するとは考えられない細胞にまで発現していることが報告され、単なる水輸送にとどまらないアクアポリンの水チャンネルとしての役割が注目されている。特にアクアポリン 1 (AQP1) に関しては、細胞の形態変化に伴う細胞内外へのイオンの流れ、体積変化に伴う細胞膜を介する水分子の移動に関与するという、細胞変形にかかわる普遍的な役割が報告されている。

細胞はその移動の際、細胞質突起を伸ばすことによって移動する。この細胞突起を伸ばす際、細胞には急速な局所的体積変化が伴う。細胞は本来疎水性の細胞膜を介して水やイオンの流入出によってこれに対応する。この際、AQP1 は細胞表面に発現していると考えられている。

歯牙発生では、上皮系、間葉系細胞による基質分泌、その後の石灰化という特異な現象を伴う。それに関与する細胞は、分化の途中でさまざまな形態変化を経ることより、細胞の形態変化、あるいは基質タンパク合成その後の石灰化の過程で水分子が大きく関与することは容易に想像がつく。本研究の目的は、具体的にどの細胞成分に、いつ、どのようなパターンで AQP1 が発現しているか詳細に解析することによって、歯牙発生過程における AQP1 の役割をあきらかにしようするものである。

歯原性細胞の歯の発生における経時的 AQP1 の発現は、胎生期には歯性上皮細胞、間葉系細胞とも AQP1 の発現は見られなかった、生後期になると生後 0 日より歯髄細胞に陽性反応が観察されるようになった。歯髄細胞での発現はその後継続した。9 日齢、歯根の形成とともに歯根象牙質の前象牙芽細胞に陽性反応が観察されるようになった。12 日齢ではセメント質の形成が観察されるが、この時期より歯根表面に一層の AQP1 陽性細胞が出現しているのが観察された。この陽性細胞はアルカリフォスファターゼ、オステオポンチン陽性を示しセメント芽細胞である可能性が示唆された。歯槽骨では固有歯槽骨の形成が始まる生後 18 日より歯槽骨上に AQP1 陽性反応が観察され、この AQP1 陽性細胞はアルカリフォスファターゼにも陽性であった。また、この細胞の歯槽骨硬組織形成能を調べるためカルセインを投与すると、AQP1 陽性細胞直下で歯槽骨の石灰化が起こっていることが観察された。また、AQP1 mRNA の発現も確認された。

以上のことから、特に固有歯槽骨形成に関して、

- ・ 歯小囊ならびに歯根膜 AQP1 陽性細胞は細網線維の産生に関与している可能性が示唆された。
- ・ AQP1 陽性線維芽細胞は ALP 陽性を示しシャーピー線維の固有歯槽骨への埋入およびその石灰化に関与して

いる可能性が示唆された。

固有歯槽骨 (束状骨) の形成は AQP1 陽性細胞の出現とともに 18 日齢頃から始まり 21 日齢頃ピークをむかえ、24 日齢頃に完成する。

AQP1 は歯根膜線維芽細胞の急激な形態変化に関連して発現されるものと考えられる。

AQP1 の発現を表にまとめた図を示す。

	胎生期	一週齢	二週齢	三週齢
歯乳頭細胞	—	/	/	/
歯小囊細胞	—	/	/	/
エナメル上皮細胞	—	—	/	/
エナメル芽細胞	—	—	/	/
象牙芽細胞	—	—	—	—
歯髄細胞	—	—+	+	+
前象牙芽細胞	—	+	+	+
セメント芽細胞	/	/	+	+
歯槽骨細胞	/	/	+	+

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 2 件)

1. Shoko-Kinoshita-Kawano, Atsunori Sugibayashi and Yo Taguchi.: Lay knowledge and attitudes on the management of traumatically avulsed teeth and the use of mouthguards Pediatric Dental Journal. 18(2): 124-130.2008
2. 杉林篤徳 木下承子 田口洋野田忠: 歯の外傷およびマウスガードに関するアンケート調査—サッカースクールの指導者と保護者との比較— 小児歯誌 45(4)451-457 2007 (査読有り)

[学会発表] (計 7件)

1. 木下-河野承子他: ラット臼歯歯根象牙芽細胞におけるアクアポリン1の一過性の発現. 第50回歯科基礎医学会学術大会・総会, 東京, 2008. 9. 23-25.
2. 河野芳朗他: ヘルトビッチの上皮鞘の断裂に伴うアクアポリン1陽性細胞の出現とネスチンの発現. 第50回歯科基礎医学会学術大会・総会, 東京, 2008. 9. 23-25.
3. 河野承子他: ラット臼歯発生過程におけるアクアポリン1 (AQP1) の発現. 第46回日本小児歯科学会大会, 埼玉, 2008. 6. 12-13.
4. 河野芳朗他: ラット臼歯発生におけるカルサイクリンの発現. 第113回日本解剖学会総会・全国学術大会, 大分, 2008. 3. 27-29
5. Kawano Y et al: Identification of calyculin expression in rat amelogenesis using ACP DDRT-PCR method. 29th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Honolulu, Hawaii, 2007. 9. 16-19.
6. 河野芳朗他: セメント質, 歯槽骨に近接する歯根膜細胞におけるアクアポリン1 (AQP1)の発現. 第49回歯科基礎医学会学術大会・総会, 札幌, 2007. 8. 29-31.
7. 河野芳朗他: ACP ディフアレンシャルディスプレイ法によるエナメル質形成に関与する遺伝子の検索ーラット切歯における Calyculin (S100A6)の発現. 第112回日本解剖学会総会・全国学術大会, 大阪, 2007. 3. 27-29.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 承子 (KAWANO SHOKO)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号:10397127

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし