

論文要旨等報告書

氏名	秦 正 樹
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 乙 第 4 2 3 6 号
学位授与の日付	平成 2 0 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	エナメル芽細胞におけるタイトジャンクションの免疫組織化学的研究 -オクルディンおよびクローディンの発現パターン-
論文審査委員	教授 吉山 昌宏 准教授 長塚 仁 教授 山本 敏男

学位論文内容の要旨

タイトジャンクション (TJ) は上皮細胞間のバリア構造であり、細胞間隙の輸送制御に機能する。TJ を構成するタンパクとしてはオクルディン (OLD) とクローディン (CLD) が知られている。OLD は上皮細胞の TJ に普遍的に存在する。他方、CLD は 24 種類存在し、TJ における CLD の発現は組織、細胞特異的であることが報告されており、上皮細胞間輸送ならびに細胞機能と密接に関連することが示唆されている。口腔粘膜上皮から分化したエナメル芽細胞はエナメル質形成を行う。エナメル芽細胞における TJ の存在は凍結レプリカ法により報告されており、エナメル質形成においてエナメル芽細胞層を介した溶質およびミネラル輸送に TJ は重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、エナメル芽細胞における形成期、成熟期におけるそれぞれの TJ の分布や構成タンパクについてはよく分かっていない。

本研究はエナメル芽細胞層を介する輸送機構と TJ について着目し、マウス切歯を用いて OLD ならびに CLD の発現を免疫組織化学的に調べた。

材料と方法

実験動物は 5-6 週齢のマウス (C57BL6/J) を用いた。麻酔後断頭屠殺し、マウス頭部をただちに液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結して 5% carboxymethyl cellulose に包埋した。OLD ならびに CLD の免疫組織化学的検出に際しては未固定未脱灰凍結切片を用いた。切片の作製にあたっては凍結フィルム法を用い、約 5 μ m の未脱灰切歯の凍結切片を作製した。一部の動物については凍結切片下で成熟期エナメル芽細胞の ruffle-ended ameloblast (R-A) と smooth-ended ameloblast (S-A) を区別するために 0.04% カルセイン水溶液を麻酔下で心臓に注射し、10min 後に頭部を採取した。免疫組織化学は、切歯凍結切片を 95% エタノールで 20°C 30min 浸漬後、引き続き 100% アセトンで 1min 室温固定した。一次抗体として抗 OLD モノクローナル抗体および抗 CLD-1 から CLD-10 までのポリクローナル抗体 10 種類を用いた。

一次抗体の反応は室温で4時間行った。二次抗体はCy3で標識された抗体を用い、室温で1時間反応を行った後、位相差像ならびに蛍光像を観察した。

結果ならびに考察

観察に際しては形成期エナメル芽細胞と成熟期エナメル芽細胞について行い、成熟期についてはさらに ruffle-ended ameloblast (R-A) と smooth-ended ameloblast (S-A) に分けて観察した。

形成期エナメル芽細胞では遠心端に OLD と CLD-1, 8 と 9 が発現していた。他の CLD 種、すなわち CLD-2, -3, -4, -5, -6, -7, および-10 は反応が認められなかった。成熟期エナメル芽細胞では OLD と CLD-1, -6, -7, -8, -9, および-10 が陽性反応を呈しており、形成期には発現が認められなかった CLD-6, -7 と-10 が新たに発現していた。形成期ならびに成熟期についての OLD ならびに CLD 種の発現についての報告はなく、本研究によって初めて示されたものである。

成熟期エナメル芽細胞では OLD と形成期に認められた CLD 種に加えて CLD-6, -7 および-10 があらたに発現していることについては、成熟期エナメル芽細胞の機能がエナメルタンパクの分解・脱却、水分の脱却ならびにカルシウム等のミネラル輸送であることから CLD-6, -7, -10 はこれらの輸送に関与すると考えられた。

成熟期の OLD と CLD 種の陽性反応は特徴的な局在を呈していた。すなわち、OLD の蛍光は近心端と遠心端の両端にみられ、二本の平行線を呈するように陽性反応が認められた。

一般に上皮細胞における TJ は細胞の頂部領域に存在するが、成熟期エナメル芽細胞では頂部領域と基底側の 2 箇所のみみられ、他の上皮細胞にはみられない特異な分布をすることが明らかになった。これらの TJ 局在は成熟期における活発な物質輸送の制御ならびに、細胞の近遠心側に基底膜が欠如することに関連するものと考えられた。

成熟期エナメル芽細胞の R-A と S-A は機能的差異があることが知られているので、OLD, CLD の発現パターンについてカルセイン投与により R-A 領域と S-A 領域を識別して観察したが、両者に差異がないことが明らかになった。また、発現パターンについて差異が認められないのは、R-A と S-A が周期的且つ相互に移行するためと推察された。

論文審査結果の要旨

タイトジャンクション (TJ) は上皮細胞間のバリア構造であり、細胞間隙の輸送制御に機能する。TJ を構成するタンパクとしてはオクルディン (OLD) とクローディン (CLD) が知られている。OLD は上皮細胞の TJ に普遍的に存在が、他方 CLD は 24 種類存在し、その発現は組織、細胞特異的であり、且つ上皮細胞間輸送ならびに細胞機能と密接に関連することが示唆されている。エナメル芽細胞は口腔粘膜上皮から分化し、エナメル質形成に際してエナメルタンパクやミネラル輸送を活発に行い、これらの輸送に TJ は重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、エナメル芽細胞の形成期、成熟期におけるそれぞれの TJ の分布や構成タンパク、特に CLD 種についてはよく分かっていない。

本研究はエナメル芽細胞層を介する輸送機構と TJ について着目し、マウス切歯を用い、形成期ならびに成熟期エナメル芽細胞の OLD ならびに CLD の発現を免疫組織化学的に追求したものである。その結果、形成期エナメル芽細胞では遠心端に OLD と CLD-1, 8 と 9 が発現していた。他方、成熟期エナメル芽細胞では OLD と CLD-1, -6, -7, -8, -9, および-10 が陽性反応を呈しており、形成期には発現が認められなかった CLD-6, -7 と-10 が新たに発現していた。成熟期のこれら OLD と CLD の陽性反応は特徴的な局在を呈しており、すなわち近心端と遠心端の両端に局在性が認められた。これらの発現パターンをカルセイン投与により ruffle-ended ameloblast 領域と smooth-ended ameloblast 領域を識別して観察すると、両者に差異は認められなかった。

以上の結果から、エナメル芽細胞に発現する CLD のタイプが初めて示され、形成期と成熟期エナメル芽細胞で発現する CLD のタイプが異なっていることが明らかとなった。また、従来の所見とは異なり、成熟期エナメル芽細胞では近遠心両端に TJ が存在することが示された。さらに形成期と成熟期エナメル芽細胞で発現する CLD のタイプが異なっていることが明らかとなった。これらの所見はエナメル質形成において、ミネラルを始めとするエナメル芽細胞層を介する物質輸送の機構を解明するうえで新たな視点を与える重要なものと考えられる。したがって、審査員一同本論文は博士 (歯学) の学位論文として価値あるものと認めた。