

## エナメル質形成におけるサイトカインによる アポトーシス調節因子の局在性

龍 崎 健 栄 多賀谷 正 俊 棚 瀬 精 三  
田 村 康 夫

### Localization of Apoptosis and Survival Factors Mediated by Cytokine in Amelogenesis.

RYUZAKI KENEI, TAGAYA MASATOSHI, TANASE SEIZO and TAMURA YASUO

サイトカインには、細胞の増殖、分化、生存に関わり、アポトーシスに対して抑制因子として働くものと誘導因子となるものが示唆されているが、歯形成におけるアポトーシス調節機構は明らかではない。

本研究はラット臼歯エナメル芽細胞の増殖期から成熟期におけるアポトーシスの調節機構を知るため、Interleukin (IL) レセプター (R) からの生存シグナルと Interferon (IFN) によるアポトーシス誘導シグナルの局在性を免疫組織化学的に検討した。実験には5, 7, 10日齢のS.D.系ラットを用い、頭部矢状断の凍結切片を使用した。

IFN-によるアポトーシス誘導シグナルは、特にアポトーシスの見られる移行期エナメル芽細胞近心端および中間層細胞に強い発現が示された。一方、IL-Rからの生存シグナルは、移行期の近心端および中間層細胞ではダウンレギュレーションが見られた。エナメル質形成におけるアポトーシスには、異種のサイトカインからのアポトーシス誘導シグナルと、生存シグナルとが相互に関わり調節していることが示唆された。

キーワード：アポトーシス，エナメル質形成，IL レセプター，IFN- $\gamma$ ，ラット臼歯

*Cytokines and their receptor-linked signaling have been classified as survival and apoptosis factors. It has been known that interleukin (IL) 2, 5, 6 receptors (R) are able to induce survival signaling, while interferon (IFN) inhibits cell growth and induces apoptosis signaling in many types of cells. While it has been reported that apoptosis plays an important role in odontogenesis, little is known about the cellular and molecular events involved. Intense immunohistochemical staining for IL 2, 5, 6 R, and survival signaling were co-localized in the cells of pre-ameloblasts, pre-secretory, secretory and early maturation-stage ameloblasts, while they faded in the transition-stage ameloblasts. Intense staining of IFN- and induced apoptosis signaling were localized in the transition-stage ameloblasts. These findings suggest that different types of cytokine involved in either survival factor or apoptosis factor, regulate the apoptosis in amelogenesis.*

Key words: Apoptosis, Amelogenesis, IL-receptor, IFN- $\gamma$ , Rat molar

### 緒 言

アポトーシスは遺伝子により制御され、組織の再構成を目的とした積極的な細胞排除過程であり、生体の組織形成、恒常性の維持において重要な過程である。多細胞をもつ組織の発育は、増殖、分化、アポトーシ

スとの巧妙なバランスにより起こることが示唆されてきている<sup>1)</sup>。

エナメル芽細胞は、増殖を示す内エナメル上皮、分化期（分泌前期）エナメル芽細胞を経て、基質分泌の分泌期エナメル芽細胞へと発育し、さらに石灰化を中心として水分やエナメルタンパクを排除しミネラル成

朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座小児歯科学分野  
501 0296 岐阜県瑞穂市穂積1851  
Department of Pediatric Dentistry, Division of Oral Structure, Function and Development

Asahi University School of Dentistry  
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501 0296, Japan  
(平成18年8月1日受理)

分に置き換える成熟期エナメル芽細胞へと、まったく機能の異なる細胞に移行する。SmithとWarshwsky<sup>2)</sup>がラット切歯において<sup>3</sup>H-thymidineを用いた詳細な組織化学的観察から、移行期エナメル芽細胞に約25%の細胞死があり、さらに成熟期エナメル芽細胞の約25%に細胞死を起こすことを示した。アポトーシスは核クロマチンDNAの規則的な断片化と細胞自身の断片化を特徴とするため、最近では、エナメル質形成におけるアポトーシスを抗DNA抗体を用いた免疫電顕法<sup>3)</sup>、DNA切断の組織化学的検出法としてのTUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)法<sup>4-9)</sup>により検討されてきている。アポトーシスは、移行期エナメル芽細胞と隣接する中間層細胞に著明に認められ、その前後の分泌期後期、成熟期初期にも認めることが一致した所見である。この移行期エナメル芽細胞と隣接する中間層細胞に著明に起こるアポトーシスは成熟期に入るためのエナメル芽細胞の著明な組織再構成に関わり、エナメル芽細胞の高さの減少とともに機能の変化、隣接する中間層細胞と乳頭層細胞の細胞間との混雑性の減少を示唆すると考えられている<sup>10-12)</sup>。

歯の形成におけるアポトーシス調節因子には、現在まで、誘導因子としてDipeptidyl peptidase II (DDP II)<sup>3)</sup>、Sulphated glycoprotein-2 (SGP-2)<sup>4)</sup>、Msx-2<sup>15)</sup>、MHC Class II<sup>16)</sup>、BMP-4<sup>6)</sup>、Fas リガンド<sup>17)</sup>が報告されている。一方、抑制因子にはIGF-1<sup>18)</sup>、EGF、FGF-4<sup>6)</sup>が示唆されている。エナメル芽細胞の増殖、分化、アポトーシスとの巧妙なバランスの制御機構についての報告は少ない<sup>19, 20)</sup>。

サイトカインは生体内で様々な生理活性を有する糖蛋白であり、その細胞内シグナルには細胞の増殖、分化、活性化など様々なものが含まれている<sup>21)</sup>。歯の形成におけるサイトカインレセプターと細胞内シグナル伝達の局在性から、サイトカインがエナメル質形成に関わることが示唆されている<sup>22-25)</sup>。最近、サイトカインとその細胞内シグナルには、細胞の生存シグナル、あるいはアポトーシス抑制因子として作用するものと、アポトーシス誘導因子として作用するものがあることが示唆されてきている<sup>26, 27)</sup>。多くのILの細胞内シグナル伝達には、Jak/STAT経路のほか、Rasからのホスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI3 Kinase) およびAktが生存シグナルとしてアポトーシス抑制に関わることが示唆されている<sup>26)</sup>。一方、サイトカインにはアポトーシス誘導因子として、デスレセプターとも呼ばれるTNF、Fas<sup>27)</sup>のほか、IFN- $\gamma$ が示唆されている<sup>28)</sup>。また、IFN- $\gamma$ はFasにより誘導されるIFN- $\gamma$ レセプターから活性化されるInterferon regulation factor-1 (IRF-1)とSTAT-1は、さらにアポトー

シスの実行因子であるプロテアーゼのInterleukin-1 beta converting enzyme (ICE) (caspase-1)を活性化し、核内のDNA断片化を起こしアポトーシスを誘導することが示唆されている<sup>26)</sup>。

そこで、本研究では、エナメル質形成におけるサイトカインによるアポトーシス調節因子の局在性を知るため、ラット臼歯エナメル芽細胞の未分化期(増殖期)、分化期(分泌前期)、分泌期、移行期、さらに成熟期におけるILレセプターとそれらからのアポトーシス抑制シグナルとIFN- $\gamma$ によるアポトーシス誘導シグナルとの局在性を免疫組織化学的に検討した。

### 実験材料および方法

実験にはSprague-Dawley (S.D.)系ラットを中部科学資材社(名古屋)より購入し、実験は「朝日大学実験動物取扱指針」に従い行った。

#### 免疫組織化学法

免疫組織化学的局在性の観察は、5、7、10日齢のS.D.系ラットを用い、上顎第一および第二臼歯を含む、頭部矢状断の凍結切片(厚さ約18 $\mu$ m)は凍結切片作製装置(Bright Instrument Company Ltd., Hutingdon, U.K.)により作製した。凍結切片は透明粘着テープに貼付させ、-20℃に2日間保管し、凍結乾燥後、切片は結露防止のためプラスチック製密閉箱に入れて室温に戻した。この方法は、Bawdenら<sup>29)</sup>が確実にしたものである。

IL-Rからの生存シグナルの局在性についてはIL-2、-5、-6レセプター、PI3-kinaseおよびAkt-1ポリクロナール抗体を、IFN- $\gamma$ によるアポトーシス誘導シグナルの局在性については、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\gamma$ レセプター、STAT-1、IRF-1およびICEポリクロナール抗体を用いて免疫組織化学法はABC法により行った。ポリクロナール抗体は、すべてサンタクルーズ社(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)から購入し使用した。Avidin-Biotinブロッキングキット(Vector Burlingame, CA, U.S.A.)を用いてブロッキング後、4%正常ブタ血清、または4%正常ウサギ血清によりブロッキングを行った。その後、それぞれの一次抗体(IL-2R, 4 $\mu$ g/ml; IL-5R, 2 $\mu$ g/ml; IL-6R, 4 $\mu$ g/ml; Akt-1, 4 $\mu$ g/ml; PI3-k, 4 $\mu$ g/ml; IFN- $\gamma$ , 2 $\mu$ g/ml; IFN- $\gamma$  R, 10 $\mu$ g/ml; IRF-1, 2 $\mu$ g/ml; Jak-1, 0.5 $\mu$ g/ml; STAT-1, 1 $\mu$ g/ml; ICE, 4 $\mu$ g/ml)を反応させ、4時間の冷蔵庫内に保管し20時間インキュベートさせた。その後、それぞれの二次抗体(ブタ抗ウサギIgG, ウサギ抗ヤギIgG 0.56 $\mu$ g/ml; DAKO Carpinteria, CA, U.S.A.)を60分間反応させ、ABCComplex (DAKO Carpinteria, CA, U.S.A.)を30分間反応させた。その後、0.03%

3.3' ジアミノベンチジン(DAB)溶液(Sigma St. Louis, MO, U.S.A.; 1 mg DAB/1.5 ml TBS + 1.2 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)にて染色を行い観察した。

また、ネガティブコントロールとして、一次抗体を作用させず、それぞれの血清と二次抗体を反応させた。なお、すべての観察部位は、上顎第一臼歯について行った。

### 結 果

IL-2, -5, -6R からの生存シグナルの免疫組織化学的局在性

5日齢ラット第一臼歯は、内エナメル上皮である未分化期エナメル芽細胞、象牙基質分泌後、細胞が徐々に極性化しエナメル基質を合成する分化期エナメル芽細胞、分泌期エナメル芽細胞を有している。なお、エナメルマトリックスは、ネガティブコントロールにおいて染色が認められたため、非特異的な染色と見なした。

IL-2R は、未分化期、分化期および分泌期エナメル芽細胞に強い局在性を示した。7日齢では、分泌期後期、移行期エナメル芽細胞近心端および隣接する中間層細胞には弱い局在性を示した。10日齢では、分泌期後期および移行期エナメル芽細胞に弱い局在性を示すが、成熟期の近心端および細胞内遠心側にやや強い局在性がみられ、隣接する乳頭層細胞では強い局在性を認めた(図1)。

IL-5, -6R も IL-2R とほぼ同様に、5日齢では、未分化期、分化期および分泌期エナメル芽細胞に強い局在性を示す。7日齢では、分泌期後期、移行期エナメル芽細胞近心端および隣接する中間層細胞では弱い局在性を示した。10日齢では、分泌期後期、移行期エナメル芽細胞では、弱い局在性を示すが、成熟期に入ると近心端および細胞内遠心側にやや強い局在性がみられ、隣接する乳頭層細胞では強い局在性を認めた(図2)。

PI3-K は、未分化期、分化期と分泌期エナメル芽細胞の近心端部と細胞内部に強い局在性が認められた。7日齢では同様に、未分化期、分化期および分泌期エナメル芽細胞に強い局在性を示した。7日齢では、分泌期後期、移行期エナメル芽細胞内ではやや強い局在性がみられるが、近心端および隣接する中間層細胞では局在性が認められなかった。10日齢では、分泌期後期と移行期エナメル芽細胞内部では若干強い局在性がみられるが、近心端部および隣接する乳頭層細胞では弱い局在性を示した。成熟期に入ると細胞遠心側および近心端部に強い局在性が認められ、乳頭層細胞においても強い局在性を示した(図3)。

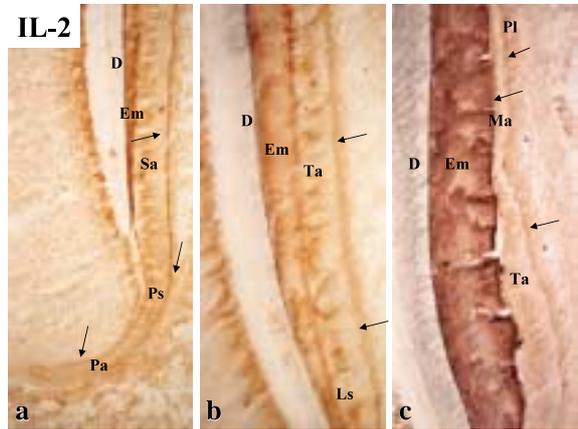


図1. IL-2レセプターの免疫組織化学的染色像。a) IL-2レセプターは、未分化期エナメル芽細胞(Pa)では歯乳頭に隣接する遠心端部にやや強い染色性を示し、分化期(Ps)および分泌期エナメル芽細胞(Sa)の近心端および細胞遠心側約1/2に強い染色性の局在性を示す(矢印)。b, c)分泌期後期(Ls), 移行期エナメル芽細胞(Ta)近心端および隣接する中間層細胞における染色性は弱い(矢印)。c) 成熟期(Ma)に入ると近心端および細胞遠心側に染色性がやや強くなり、また隣接する乳頭層細胞(Pl)にもやや強い染色性を認める(矢印)。

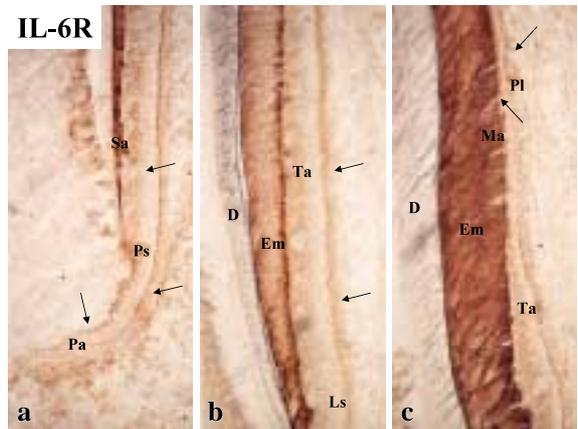


図2. IL-6レセプターの免疫組織化学的染色像。a) IL-6レセプターもIL-2レセプターとほぼ同様に、未分化期エナメル芽細胞(Pa)遠心端部にやや強い染色性を示し、分化期(Ps)および分泌期エナメル芽細胞(Sa)の近心端および細胞遠心側約1/2に強い染色性を示す(矢印)。b, c)分泌期後期(Ls), 移行期エナメル芽細胞(Ta)近心端および隣接する中間層細胞では弱い染色性を示す(矢印)。c) 成熟期(Ma)では近心端、細胞内遠心側にやや強い染色性がみられ、また隣接する乳頭層細胞(Pl)に強い染色性の局在性を認める(矢印)。

Akt-1は、未分化期、分化期および分泌期エナメル芽細胞の近心端部に強い局在性を示した。7日齢では、分泌期後期、移行期エナメル芽細胞近心端および隣接する中間層細胞には弱い局在性を示した。10日齢

では、分泌期後期と移行期エナメル芽細胞内部および近心端部では弱い局在性を示すが、成熟期に入ると細胞内遠心側にやや強い局在性を示した。また、隣接する乳頭層細胞においても若干強い局在性を示した(図

4)(表1)。

IFN- $\gamma$ からのアポトーシス誘導シグナルの免疫組織学的局在性

IFN- $\gamma$ は5日齢第一臼歯では、未分化エナメル芽細胞において、歯乳頭との隣接部では弱い局在性を示すが、分化期と、分泌期エナメル芽細胞の近心端に強い局在性を示した。7日齢では、分泌期後期近心端ではやや強いが、移行期エナメル芽細胞近心端および隣接する中間層細胞に若干弱い局在性を示した。しかし、分泌期後期および移行期エナメル芽細胞内遠心側約1/2に、もっとも強い局在性を示した。10日齢は分泌期後期および移行期エナメル芽細胞の局在性は7日齢と同様であった。成熟期エナメル芽細胞および隣接する乳頭層細胞では弱い局在性を示した(図5)。

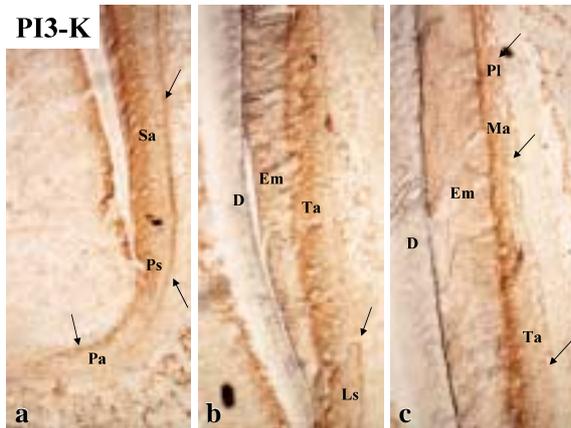


図3. PI3-Kの免疫組織化学的染色像。

a) PI3-Kは、未分化期エナメル芽細胞(Pa)遠心端部にやや強い染色性を示し、分化期(Ps)と分泌期エナメル芽細胞(Sa)の近心端部と細胞遠心側約1/2に強い染色性が認められる(矢印)。b, c) 分泌期後期(Ls), 移行期エナメル芽細胞(Ta)内ではやや強い染色性がみられるが、近心端および隣接する中間層細胞では染色性が認められない(矢印)。c) 成熟期(Ma)では細胞近心端部、遠心側に強い局在性が認められ、隣接する中間層細胞、乳頭層細胞(Pl)においても強い染色性の局在を示す(矢印)。

表1. ラット臼歯エナメル質形成におけるL-2, -6レセプターおよびアポトーシス抑制シグナルの免疫組織化学的局在性(Am: エナメル芽細胞)

	IL-2R	IL-6R	PI3-K	Akt-1
未分化Am	+	+	++	++
分化期Am	++	++	++	++
分泌期Am	+++	+++	+++	++
中間層細胞	+	+	+	+
分泌期後期Am	++	+	+	+
中間層細胞	+	+	+	+
移行期Am	±	±	±	+
中間層細胞	±	±	±	+
成熟期Am	++	++	+++	++
乳頭層細胞	++	++	+++	++

+++ : 最も強い染色性, ++ : 強い染色性, + : やや強い染色性  
± : 弱い染色性, - : 染色性なし

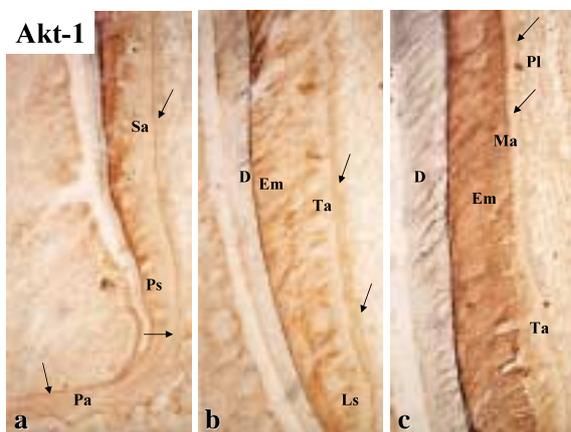


図4. Akt-1の免疫組織化学的染色像。

a) Akt-1は、未分化期エナメル芽細胞(Pa)遠心端部にやや強い染色性を示し、分化期(Ps)と分泌期エナメル芽細胞(Sa)の近心端部と細胞遠心側約1/2に強い染色性を示す(矢印)。b, c) 分泌期後期(Ls), 移行期エナメル芽細胞(Ta)近心端および隣接する中間層細胞では弱い染色性を示す(矢印)。c) 成熟期(Ma)では細胞内遠心側にやや強い染色性を示し、隣接する乳頭層細胞(Pl)においても強い染色性を認める(矢印)。

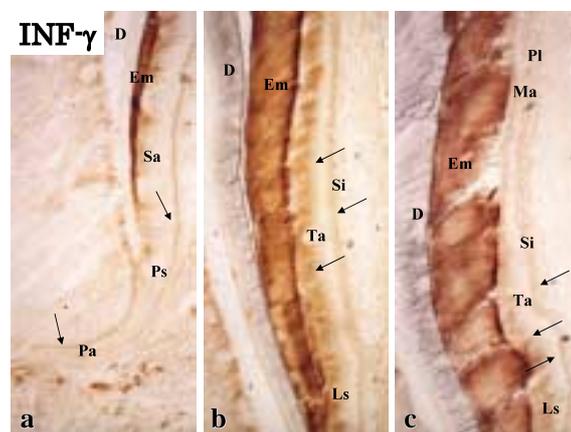


図5. INF- $\gamma$ の免疫組織化学的染色像。

a) INF- $\gamma$ は、未分化期エナメル芽細胞(Pa)では弱い染色性を示すが、分化期(Ps)と、分泌期エナメル芽細胞(Sa)の近心端にやや強い染色性を示す(矢印)。b, c) 分泌期後期(Ls), 移行期エナメル芽細胞(Ta)近心端および隣接する中間層細胞(Si)に弱い染色性を示すが、それらの細胞の遠心側1/2に強い染色性を示す(矢印)。c) 成熟期エナメル芽細胞(Ma)および隣接する乳頭層細胞(Pl)では弱い染色性を示す(矢印)。

IFN- $\gamma$  R は、IFN- $\gamma$  と同様に、未分化エナメル芽細胞では、歯乳頭との隣接部で弱い局在性であるが、分化期と、分泌期エナメル芽細胞の近心端に強い局在性を認めた。7日齢では、分泌期後期近心端および移行期エナメル芽細胞近心端およびそれらの細胞内遠心側にやや強い局在性を認めた。10日齢の分泌期後期および移行期のIFN- $\gamma$  の局在性は7日齢とほぼ同様であり、成熟期エナメル芽細胞および隣接する乳頭層細胞では弱い局在性を示した(図6)。

IRF 1は、未分化期の局在性は弱く、分化期から分泌期初期において強い局在性を示し、分泌初期に最も強い局在性を示した。また、象牙芽細胞においても象牙基質分泌開始期に強い局在性を示した。7日齢では、IRF-1はIFN- $\gamma$ 、IFN- $\gamma$  レセプターとほぼ同様に、分泌期後期近心端部と移行期エナメル芽細胞では近心端部および中間層細胞に強い局在性がみられた。また、それぞれの細胞内中央から遠心側にやや強い局在性を示した。10日齢も同様に、分泌期後期および移行期エナメル芽細胞近心端および隣接する中間層細胞にやや強い局在性を示し、その後、局在性の低下を示した。また、細胞内では分泌期後期、移行期ともに細胞内中央より遠心側にやや強い局在性を示した(図7)。

STAT-1 は、未分化期の局在性は弱いが、分化期、分泌期エナメル芽細胞近心端および中間層細胞に強い局在性が認められた。7日齢では、分泌期後期および移行期エナメル芽細胞近心端および隣接する中間層細胞

に局在を示したが、分泌期後期、移行期ともに細胞内中央より遠心側にやや強い局在性を示し、遠心端部に強い局在性を示した。10日齢では、STAT-1 は分泌期後期および移行期エナメル芽細胞近心端および隣

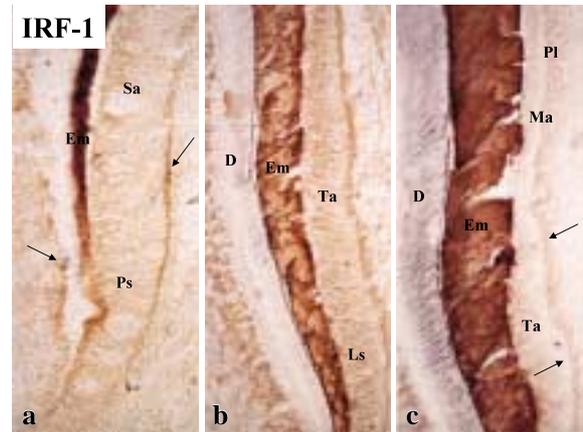


図7. IRF-1 の免疫組織化学的染色像。

a) IRF-1 は、未分化エナメル芽細胞(Pa)の染色性は弱く、分化期(Ps)から分泌期(Sa)初期において強い染色性を示し、分泌期(Sa)初期に限局して最も強い染色性の局在を示す。また、象牙芽細胞においても象牙基質分泌開始期に強い染色性を示す(矢印)。b, c) 分泌期後期(Ls)近心端部と移行期エナメル芽細胞(Ta)では、近心端、細胞遠心側および隣接する中間層細胞にやや強い染色性を示す(矢印)。c) 成熟期ではエナメル芽細胞(Ma)および隣接する乳頭層細胞(Pl)に弱い染色性を示す(矢印)。

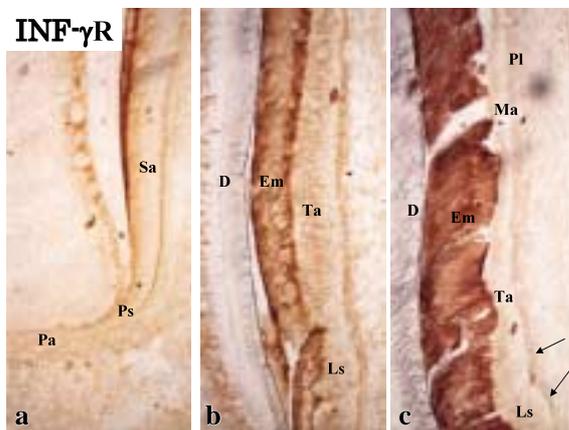


図6. INF- $\gamma$  レセプターの免疫組織化学的染色像。

a) INF- $\gamma$  レセプターは、INF- $\gamma$  と同様に、未分化エナメル芽細胞(Pa)の染色性は弱いが、分化期(Ps)と、分泌期エナメル芽細胞(Sa)の近心端にやや強い染色性を認める(矢印)。b, c) 分泌期後期(Ls)、移行期エナメル芽細胞(Ta)近心端、隣接する中間層細胞および細胞遠心側1/2にやや強い染色性を認める(矢印)。c) 成熟期エナメル芽細胞(Ma)および隣接する乳頭層細胞(Pl)では弱い染色性を示す(矢印)。

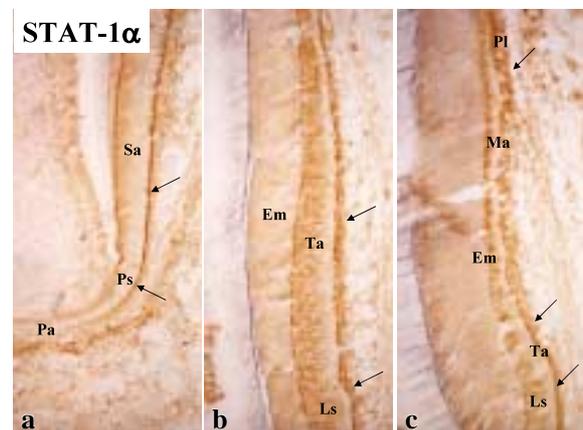


図8. STAT-1 の免疫組織化学的染色像。

a) STAT-1 は、未分化期(Pa)の染色性は弱いが、分化期(Ps)、分泌期エナメル芽細胞(Sa)近心端に強い染色性を認める(矢印)。b, c) 分泌期後期(Ls)および移行期エナメル芽細胞(Ta)近心端および細胞内中央より遠心側にやや強い染色性を示し、隣接する中間層細胞に強い染色性を示す(矢印)。c) 成熟期エナメル芽細胞(Ma)では、近心端と細胞遠心側および隣接する乳頭層細胞(Pl)に染色性が認められる(矢印)。

接する中間層細胞に強い局在性を示し，成熟期エナメル芽細胞では，隣接する乳頭層細胞に局在性が認められた（図8）。

ICEは，未分化期エナメル芽細胞では局在性が見られず，分化期，分泌期エナメル芽細胞近心端部に強い局在性がみられた．7日齢では，分泌期後期近心端部と移行期エナメル芽細胞では近心端部および隣接する中間層細胞に強い局在性を示した．10日齢では，ICEは同様に，分泌期後期から移行期エナメル芽細胞近心端部，およびそれに隣接する中間層細胞に限局して強い局在性を示した（図9）（表2）。

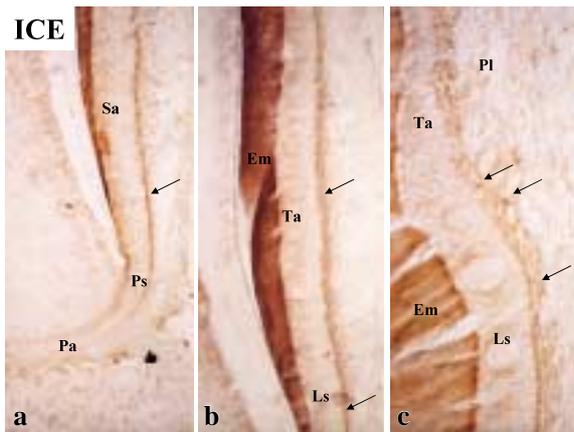


図9．ICEの免疫組織化学的染色像．

a) ICEは，未分化期エナメル芽細胞(Pa)では染色性がみられず，分化期(Ps)，分泌期エナメル芽細胞(Sa)近心端部に強い染色性がみられる(矢印)．b) 分泌期後期(Ls)と移行期エナメル芽細胞(Ta)では近心端部および隣接する中間層細胞に強い染色性の局在を示す(矢印)．c) 成熟期エナメル芽細胞(Ma)では染色性は弱く，10日齢臼歯の分泌期後期(Ls)から移行期エナメル芽細胞(Ta)近心端部およびそれに隣接する中間層細胞の染色性は7日齢のそれらの細胞に比べて弱い，特に矢印で示す部分で点状の強い染色性の局在が認められる(矢印)．

表2．ラット臼歯エナメル質形成における IFN- $\gamma$ ，IFN- $\gamma$ R，IFN- $\gamma$ R，STAT-1 $\alpha$ ，ICEレセプターおよびアポトーシス誘導シグナルの免疫組織化学的局在性（Am：エナメル芽細胞）

	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ R	IFN- $\gamma$ R	STAT-1 $\alpha$	ICE
未分化Am	±	±	±	±	±
分化期Am	++	++	+	+++	++
分泌期Am	++	++	+++	+++	++
中間層細胞	+	+	+	+	+
分泌期後期Am	++	++	++	+++	++
中間層細胞	++	++	+	+++	+
移行期Am	++	++	++	+++	++
中間層細胞	++	++	++	+++	++
成熟期Am	±	±	±	++	±
乳頭層細胞	+	+	+	+++	+

+++：最も強い染色性，++：強い染色性，+：やや強い染色性  
±：弱い染色性，-：染色性なし

## 考 察

多くのサイトカインによるアポトーシス抑制メカニズムの中心は，ミトコンドリア外膜上に存在する Bcl 2スーパーファミリー<sup>30-32</sup>)であり，アポトーシス実行因子であるカスパーゼ(caspase)の活性化を阻止することであると考えられている．他細胞での検討から，サイトカインレセプターからのシグナルによって活性化した PI3-K が Akt-1を活性化し，Bcl 2ファミリーの Bad，Bcl-xLなどをリン酸化する経路と，PI3-K PKC経路が生存シグナルを担っているものと考えられている<sup>33,34</sup>)．IL-2，-5，-6R および PI3-K，Akt-1は，未分化期，分化期，分泌期，分泌期後期エナメル芽細胞とそれに隣接する中間層細胞，さらに成熟期エナメル芽細胞と隣接する乳頭層細胞において強い局在性を示した．PI3-K，Akt-1はそれらの細胞内部で強い局在性を示した．これらの局在性は Kondo ら<sup>20</sup>)が報告した Bcl-2の局在性とほぼ一致した．

IL-2，-5，-6R およびアポトーシス抑制シグナルは，アポトーシスが著明に認められる移行期エナメル芽細胞の近心端および隣接する中間層細胞では局在性が弱く，ダウンレギュレーションを示した．Bcl-2も分泌期後期および移行期は弱く，ダウンレギュレーションがみられたとされる<sup>20</sup>)．Joseph ら<sup>18</sup>)も，IGF-1(insulin growth factor-1)レセプターのラット切歯エナメル芽細胞における発現を免疫組織化学的に検索し，分泌期エナメル芽細胞および成熟期エナメル芽細胞にレセプターの発現はみられたが，移行期エナメル芽細胞ではレセプターのダウンレギュレーションを報告している．IGF-1Rなどのチロシンキナーゼ型のレセプターからの細胞内シグナルにも PI3-k，Akt-1，Bcl-2の活性化があるとされる<sup>26,34</sup>)．これらのことから，アポトーシス抑制シグナルが多くのレセプターからカスケードされてクロストークして発現していることが示唆される．しかし，アポトーシスの著明な移行期エナメル芽細胞の近心端部および隣接する中間層細胞ではレセプターおよびアポトーシス抑制シグナルがダウンレギュレーションすることが示された．Takahashi ら<sup>35</sup>)は，IGF-1を添加した培養系実験でアメリロジェニン，アメリロラスチンの合成分泌を促進することから，エナメルタンパクの合成，分泌に関わることが示唆されている．従って，これらのレセプターの減少は，移行期ではその機能を徐々に終えようとしていることが推察される．また，移行期においてレセプターが発現してもアポトーシスにより即座に除去される可能性も想像される．他細胞においては IL-6R のダウンレギュレーションには，レチノイン酸により誘導されるとした報

告<sup>36)</sup>もあることから、エナメル質形成におけるレセプター発現の制御機構についてはさらなる研究が必要である。

一方、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$  およびその細胞内シグナル STAT-1、IRF-1および ICE すべてが、アポトーシスの認められる分泌期後期、移行期エナメル芽細胞に最も強い発現を示した。IFN- $\beta$  は Fas により誘導されることが示唆されており<sup>37)</sup>、Fas、Fas リガンドの最も強い発現が分泌期後期、移行期エナメル芽細胞に認められる<sup>38)</sup>ことから、エナメル質形成において、IFN- $\beta$  は Fas により誘導され、それらがアポトーシス誘導シグナルとなる可能性が考えられる。増殖停止に関わる IRF-1<sup>39)</sup> は分化期から分泌期初期エナメル芽細胞にとくに強い局在性を認めたことから、エナメル芽細胞の増殖停止に大きく関わることを示唆された。アポトーシス実行因子である ICE が分化期、分泌期にすでに局在性が認められ、分泌期後期、移行期に最も強い局在性を示した。未分化期および成熟期エナメル芽細胞は発現は弱く、分化期・分泌期エナメル芽細胞にやや強い発現を示した。

エナメル質形成における IFN- $\beta$  の作用様式はエナメル芽細胞で産生するオートクライン(自己分泌)と隣接細胞である歯乳頭および中間層細胞からのパラクライン(傍分泌)とを有することが示唆されている<sup>40)</sup>。他のサイトカインはエナメル芽細胞で産生するオートクライン、あるいは隣接細胞からのパラクラインなのかは未解明であるが、エナメル質形成において種々の IL を含むレセプターおよび細胞内の増殖、分化、および生存を示唆するシグナル<sup>41)</sup>が、エナメル芽細胞に認められる<sup>22-24)</sup>ことから、エナメル芽細胞の増殖・分化・生存が種々のサイトカインによって支配されていることは疑問の余地がない。エナメル芽細胞の増殖、分化、生存、アポトーシスはアポトーシス促進因子である Bax と抑制因子の Bcl-2、両者の発現性のバランスにより制御される<sup>20)</sup>ことが示唆されている。本研究からエナメル質形成に多くのサイトカインが関わり、しかもそれらはアポトーシス抑制因子と誘導因子および実行因子のシグナルを活性化して、それらのバランスの中で増殖、分化、生存、アポトーシスが制御されていることが示唆された。

しかしながら、サイトカインは従来より、炎症性サイトカインと非炎症性サイトカインとに分類される<sup>42)</sup>。根尖病巣内において種々のサイトカインの局在が報告されている<sup>43)</sup>。小児歯科領域において乳歯の根尖性歯周炎が形成中の後継永久歯のエナメル質形成不全をきたすことは周知のことである。形成中のエナメル器が歯胚周囲に過剰産生された各種サイトカインに

さらされた場合、生存と細胞死のバランスが崩れエナメル質形成障害をきたすことも想像される。サイトカインの量的バランスがエナメル質形成におよぼす影響について、今後さらなる研究が必要である。

## 結 論

エナメル質形成におけるサイトカインによるアポトーシス調節因子の局在性を知るため、ラット臼歯エナメル芽細胞の増殖期から成熟期における IL-R およびそのアポトーシス抑制シグナルと IFN- $\beta$  によるアポトーシス誘導シグナルとの局在性を免疫組織化学的に検討し、以下の結論を得た。

1. IL-2、 $\gamma$ 、5、6R および PI3-K、Akt-1は、未分化期(増殖期)、分泌前期(分化期)エナメル芽細胞、分泌期、分泌期後期エナメル芽細胞とそれらに隣接する中間層細胞、さらに成熟期エナメル芽細胞と隣接する乳頭層細胞において強い共在性を示した。アポトーシスが著明に認められる移行期エナメル芽細胞の近心端および隣接する中間層細胞では局在性が弱く、ダウンレギュレーションを示した。
2. IFN- $\beta$ 、IFN- $\beta$  レセプターおよびその細胞内シグナル STAT-1、IRF-1および ICE すべてが、アポトーシスの認められる分泌期後期、移行期エナメル芽細胞に最も強い発現を示した。
3. エナメル質形成に多くのサイトカインが関わり、しかもそれらはアポトーシス抑制因子と誘導因子および実行因子のシグナルを活性化して、それらのバランスの中で増殖、分化、生存、アポトーシスが制御されていることが推察された。

本論文の要旨は、第133回岐阜歯科学会例会(2000年6月17日、岐阜)において発表した。また、論文の一部は、第38回日本小児歯科学会(2000年6月22日、札幌市)、第48回 JADR 学会総会(2000年12月3日、松戸市)および第79回 IADR 学会総会(2001年6月28日、千葉市)において発表した。

## 文 献

- 1) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972; 26: 239-257.
- 2) Smith CE, Warshawsky H. Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor. *Anat Rec.* 1977; 187: 63-98.
- 3) Nishikawa S, Sasaki F. DNA localization in nuclear fragments of apoptotic ameloblasts using anti-DNA immunoelectron microscopy: programmed cell death of

- ameloblasts. *Histochem Cell Biol.* 1995; 104: 151-159.
- 4) Bronkers ALJJ, Lyaruu DM, Goei W, Litz M, Luo G, Karsenty G, W Öltgens JHM, D'Souza RN, Nuclear DNA fragmentation during postnatal tooth development of mouse and hamster and during dentin repair in the rat. *Eur J Oral Sci.* 1996; 104: 102-111.
  - 5) Shibata S, Suzuki S, Tengan T, Yamashita Y, A histochemical study of apoptosis in the reduced ameloblasts of erupting mouse molars. *Archs Oral Biol.* 1995; 40: 677-680.
  - 6) Vaahtokari A, Aberg T, Thesleff I, Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development.* 1996; 122: 121-129.
  - 7) Kaneko H, Ogiuchi H, Shimono M, Cell death during tooth eruption in the rat: surrounding tissues of the crown. *Anat Embryol.* 1997; 195: 427-434.
  - 8) Kumamoto H, Detection of apoptosis-related factors and apoptotic cells in ameloblastomas: analysis by immunohistochemistry and an in situ nick end-labelling method. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26: 419-425.
  - 9) Sasaki C, Sato T, Kozawa Y. Apoptosis in regressive deciduous tooth germs of *Suncus murinus* evaluated by the TUNEL method and electron microscopy. *Archs Oral Biol.* 2001; 46: 649-660.
  - 10) Reith EJ, The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. *J. Ultrastruct Res.* 1970; 30: 111-151.
  - 11) Kallenbach E, Fine structure of rat incisor ameloblasts in transition between enamel secretion and maturation stages. *Tissue and Cell.* 1974; 6: 173-190.
  - 12) Warshawsky H, Smith CE, Morphological classification of rat incisor ameloblasts. *Anat Rec.* 1974; 179: 423-446.
  - 13) Smid JR, Monsour PA, Rousseau EM, Young WG, Cytochemical localization of dipeptidyl peptidase II activity in rat incisor tooth ameloblasts. *Anat Rec.* 1992; 233: 493-503.
  - 14) Joseph BK, Gobe CG, Savage NW, Young WG, Expression and localization of sulphated glycoprotein-2 mRNA in the rat incisor tooth ameloblasts: relationships with apoptosis. *Int J Exp Path.* 1994; 75: 313-320.
  - 15) 里方一郎, 内山 聖 Msx 遺伝子 器官形成における上皮 間葉相互作用の誘導細胞工学. 1997; 16: 668-677.
  - 16) Nishikawa S, Sasaki F. Apoptosis (programmed cell death) of transitional ameloblasts and MHC class II expression in rat incisors. *Acta Anat. Nippon.* 1996; 71: 597-603.
  - 17) Hatakeyama S, Tomichi N, Ohara-Nemoto Y, Satoh M. The immunohistochemical localization of Fas and Fas ligand in jaw bone and tooth germ of human fetuses. *Calcif Tissue Int.* 2000; 66: 330-337.
  - 18) Joseph BK, Savage NW, Young WG, Waters MJ. Insulin-like growth factor- receptor in the cell biology of the ameloblasts: an immunohistochemical study on the rat incisor. *Epith Cell Biol.* 1994; 3: 47-53.
  - 19) Krajewski S, Hugger, A Krajewska, Reed JC, Mai J. K. Developmental expression patterns of Bcl-2, Bcl-x, Bax, and Bak in teeth. *Cell Death and Differentiation.* 1998; 5: 408-415.
  - 20) Kondo S, Tamura Y, Bawden JW, Tanase S. The immunohistochemical localization of Bax and Bcl-2 and their relation to apoptosis during amelogenesis in developing rat molars. *Archs Oral Biol.* 2001; 46: 557-568.
  - 21) 木下大成, 横田 崇, 新井賢一. 非チロシンキナーゼ型サイトカインレセプターの構造とシグナル伝達 岡山博人編, 細胞内シグナル伝達経路 増殖分化のメカニズム, メジカルビュー社, 東京. 1995. 14-34.
  - 22) Tanase S, Bawden JW. The immunohistochemical localization of signal-transduction pathway components Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2 and STAT-1 during early enamel and dentine formation in rat molars. *Archs Oral Biol.* 1996; 41: 925-940.
  - 23) Tanase S. and Bawden JW. The immunohistochemical localization of STAT-2, -3, -4 and -5 during early enamel and dentine formation in rat molars. *Archs Oral Biol.* 1996; 41: 1149-1160.
  - 24) Otsuji W, Tanase S, Yoshida S, Bawden JW. The immunohistochemical localization of the interferon- $\gamma$  and granulocyte colony-stimulating factor receptors during early amelogenesis in rat molars. *Archs Oral Biol.* 1999; 44: 173-181.
  - 25) 棚瀬精三, 尾辻 渉, 谷川良謙, 近藤 俊, 安井清子, 原田 洋, 龍崎健栄, 田村康夫. ラット臼歯エナメル器におけるインターロイキン 6およびインターロイキン 10レセプターの免疫組織化学的局在. 小児歯誌, 1999; 37: 466-474.
  - 26) 稲葉俊哉 サイトカインによる生存維持シグナル. 実験医学, 2000; 18: 2041-2044.
  - 27) 酒巻和弘 デスレセプターを介したアポトーシス誘導シグナル. 実験医学, 2000; 18: 2045-2050.
  - 28) Hoey T. A new player in cell death. *Science.* 1997; 273: 1578-1579.
  - 29) Bawden JW, Rozell B, Wurtz T, Fouda N, Hammarström L. Distribution of protein kinase C $\alpha$  and accumulation of extracellular Ca<sup>2+</sup> during early dentin and enamel formation. *J Dent Res.* 1994; 73: 1429-1436.
  - 30) Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985; 228: 1440-1443.
  - 31) Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ, Bcl-2 heterodimerized in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993; 74: 609-619.
  - 32) Oltvai ZN, Korsmeyer SJ, Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell.* 1994; 79: 189-192.
  - 33) 山村康子. アポトーシスと細胞増殖・分化シグナル伝

- 達経路 . 臨床免疫 , 1999 ; 32 : 435 440 .
- 34 ) Diaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell*. 1996; 86: 777 786.
- 35 ) Takahashi K, Yamane A, Bringas P, Caton J, Slavkin HC, Zeichner-David M. Induction of amelogenin and ameloblastin by insulin and insulin-like growth factors( IGF-I and IGF-II ) during embryonic mouse tooth development in vitro. *Connect. Tissue Res.* 1998; 38: 269 78., discussion 295 303.
- 36 ) Bissonnette RP, Brunner T, Lazarchik SB, Yoo NJ, Boehm MF, Green DR, Heyman RA. 9-cis retinoic acid inhibition of activation-induced apoptosis is mediated via regulation of fas ligand and requires retinoic acid receptor and retinoid X receptor activation. *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 5576 5585.
- 37 ) Bretz JD, Arscott PL, Myc A, Baker JR Jr. Inflammatory cytokine regulation of Fas-mediated apoptosis in thyroid follicular cells. *J Biol Chem.* 1999; 274: 25433 25438.
- 38 ) Tanase S, Kondo S, Otsuji W, Tamura Y. Apoptosis: Immunohistochemical localization of Fas-L, Fas and FADD in amelogenesis. *J Dent Res.* 2000; 79: 389.
- 39 ) Sedo A, Van Weyenbergh J, Rouillard D, Bauvois B. Synergistic effect of prolactin on IFN-gamma-mediated growth arrest in human monoblastic cells: correlation with the up-regulation of IFN-gamma receptor gene expression. *Immunol Lett.* 1996; 53: 125 30.
- 40 ) 尾辻 渉, 近藤 俊, 姚 軍, 荒木元英, 棚瀬精三, 丹羽金一郎, 田村康夫マウス臼歯エナメル器における IFN- mRNA の検出と発現および局在 . 小児歯誌 . 1999 ; 37 : 345 .
- 41 ) Mui ALF. The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 55: 1547 1558.
- 42 ) 出原賢治 アレルギー疾患とサイトカイン実験医学 . 2000 ; 18 : 2175 2180 .
- 43 ) Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol.* 1999; 44: 55 66.