

日本財団補助金による

1999年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

2000年3月10日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 姚 軍
研究機関 朝日大学歯学部小児歯科講座 研究指導者 田村康夫 職名 教授
所在地 〒501-0296 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851 電話 058-329-1492 内線 1492

研究テーマ エナメル芽細胞のCaイオン動態とその調節機構

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

学会名： 第37回日本小児歯科学会大会

内容：エナメル質形成は、分泌期と成熟期エナメル芽細胞カルシウムイオンの動態と輸送経路については、本研究は、ラット臼歯胚エナメル芽細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡と蛍光指示薬 Fluo-3 でカルシウムイオン動態を半定量的に検討した。その結果、1) Ca 蛍光指示薬 Fluo-3 (エステル型) を浸透させる際に、高浸透圧溶液との混合溶液を使用することにより、共焦点レーザー顕微鏡によるエナメル芽細胞内のCa濃度分布のイメージングが可能となった。2) エナメル芽細胞内のCaイオン濃度測定はできなかったが、Ca 蛍光指示薬の蛍光強度から、エナメル芽細胞内のCaイオンは未分化期ではやや濃度は低く、分泌前期、分泌期では中程度、成熟期では濃度が高い傾向が見られた。3) 成熟期エナメル芽細胞、近心端付近と遠心端付近に高濃度のCaイオンが交互に繰り返して見られた。

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

本研究は、共焦点レーザー顕微鏡によりエナメル芽細胞におけるCaの輸送と調節機構の研究の一部として、ラット第一臼歯歯胚の各発育段階におけるエナメル芽細胞のCaイオンの濃度分布の観察することができた。これらの研究結果を基にして、さらに、Caの輸送あるいはシグナル伝達に関わるカルシウム結合タンパクである Calmodulin, Calbindin28KD, Ca-ATPase さらにイノシトール三リン酸レセプターの局在性を免疫組織化学的により検討する予定である。

4. 研究指導者の意見

共焦点レーザー顕微鏡により、蛍光指示薬 FLUO-3 を用いて、培養化でのエナメル芽細胞内のCaイオンイメージングは国内外で初めての研究である。この結果は、エナメル芽細胞におけるカルシウムの輸送と調節機構の研究に対して、極めて良いスタートであり、この研究の今後の大きな発展を多いに期待します。

研究指導者氏名

田村康夫



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

エナメル芽細胞 Ca イオン動態とその調節機構

姚 軍

中国・陝西省西安市第二職工医院（辞職）・医師

田村康夫・朝日大学歯学部小児歯科学講座・教授

要旨：

Ca イオンの可視化の技術の進歩とともに、細胞内 Ca イオンの機能調節の機構が明らかになってきている。本研究は、エナメル芽細胞におけるカルシウムの輸送と調節機構の研究の一部として、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Ca 蛍光指示薬 FLUO-3 により、ラット第一臼歯エナメル芽細胞における Ca 濃度分布のイメージングを検索した。その結果、1) Ca 蛍光指示薬 Fluo-3（エステル型）を浸透させる際に、高浸透圧溶液との混合溶液を使用することにより、共焦点レーザー顕微鏡によるエナメル芽細胞内の Ca 濃度分布のイメージングが可能となった。2) 今回、エナメル芽細胞内の Ca イオン濃度測定はできなかったが、Ca 蛍光指示薬の蛍光強度から、エナメル芽細胞内の Ca イオンは未分化期ではやや濃度は低く、分泌前期、分泌期では中程度、成熟期では濃度が高い傾向が見られた。3) 成熟期エナメル芽細胞では隣接する乳頭層ともに高濃度の Ca イオンが観察され、石灰化中のエナメル基質にも高濃度の Ca イオンが見られた。また、これらの細胞・組織中の Ca イオン分布は一様ではなく、乳頭層とエナメル芽細胞において高濃度の Ca イオンがみられるとき、エナメル基質では Ca 濃度は低く、またその逆の濃度分布のパターンの繰り返しが観察された。未分化・分泌前期・分泌期に局在する Ca イオンは細胞の増殖・分化に関わるシグナルのセカンドメッセンジャーのほか、基質タンパク分泌という機能調節に関わることが考えられた。成熟期エナメル芽細胞では smooth-ended ameloblasts と刷子縁を持つ ruffle-ended ameloblasts との細胞集団が交互に繰り返し配列していることに基づいた結果であることが示唆された。

keywords：エナメル芽細胞， Ca イオン， 共焦点レーザー顕微鏡， Ca 蛍光指示薬

研究報告

目的：

エナメル質形成は、内エナメル上皮から分化した分泌期エナメル芽細胞がエナメル基質タンパクを分泌し、成熟期エナメル芽細胞では有機性基質の脱却と同時に大量の Ca イオンなどのミネラルが添加され、急速に石灰化が進む。エナメル質形成における Ca イオンの動態について、従来 Ca^{45} を用いたエナメル芽細胞へのオートラジオグラフィーのほか、エナメル基質に対して GBHA、Alizarin-red など Ca イオン染色法により、石灰化に必要な Ca イオンの輸送に注目されてきた。最近、エナメル芽細胞内の Ca イオンは、石灰化に関わる輸送のほか、細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーとして、細胞の増殖・分化、機能調節に関わっていることが示唆されてきている。

近年、共焦点レーザー顕微鏡により、筋細胞、神経細胞などにおいて Ca 蛍光指示薬を用いて、細胞生存下での細胞内 Ca イオン濃度分布および濃度測定が可能になってきている。またこの手法により、細胞内 Ca イオン動態とその調節機構がより詳細にされてきている。

本研究は、エナメル芽細胞における Ca イオンの細胞内輸送と細胞機能調節機構の研究の第一段階として、生後 5, 7, 10 日齢ラットの上顎第一臼歯歯胚を用いて、共焦点レーザー顕微鏡によりエナメル芽細胞における Ca イオン濃度分布を検索すると目的にした。

方法：

A. 実験材料

1) ラット臼歯歯胚

生後 5, 7, 10 日齢のラット上顎第一臼歯歯胚をそれぞれ摘出し、矢状方向で左右均等に 2 分割した。

2) 器具・機械

- ・共焦点レーザー顕微鏡 (MRC-1024 ; BIO-RAD 社)
- ・自作チャンバー

3) Ca 指示薬の調整

1) ジメチロスルホキシド (Nacalai tesque 社) で FLUO-3 を溶解し、 $40\mu\text{M}$ FLUO-3 (エステル型, 蛍光指示薬 ; Molecular probes 社) と $2\mu\text{M}$ Pluronic F-127 (高浸透圧剤 ; Molecular probes 社) を混合し、Ca 指示薬 5ml を作成。

2) PEG (Molecular probes 社) を熱湯で溶解し、HBSS (Hanks Buffer Saline Solution;

GibcoBRL 社) 5ml を加える。

3) Ca 指示薬がエナメル芽細胞内への浸透性を高めるため、1) と 2) 液を混合して、高浸透圧性蛍光指示薬を作成。振動後、37 °C で保温する。

B. 実験方法

1) 2 分割した歯胚を、40 μ M FLUO-3 溶液に浸漬し、37 °C で 15 min 静置。

2) 低浸透圧溶液 (HBSS : 蒸留水 = 6 : 4) に、37 °C で 10min 静置。

3) 細胞内浸透圧回復のため、HBSS へ 10min 浸漬。

4) 断面を上にして、HBSS で満たした自作チャンバー内に装着。

5) 488nm の蛍光で観察し位置を確認後、Power: 3%, Iris: 2.3, Gain: 1124 で走査する。

6) 画像観察終了後、Z 軸方向 (上下) に 5 μ m 毎に、共焦点面を変化させて、画像を採取 (後処理として重ね合わせ画像。ラット断頭から観察終了まで一時間半に限定した)。

7) OS/2 Lasershape で画像を分析する。

結果：

1. ラット臼歯に Ca 蛍光指示薬 Fluo-3 (エステル型) を浸透させる際に、高浸透圧溶液との混合溶液を使用することにより、共焦点レーザー顕微鏡によるエナメル芽細胞内の Ca 濃度分布のイメージングが可能となった。

2. 今回、エナメル芽細胞内の Ca イオン濃度測定はできなかったが、Ca 蛍光指示薬の蛍光強度から、エナメル芽細胞内の Ca イオンは未分化期ではやや濃度は低く、分泌前期、分泌期では中程度、成熟期では濃度が高い傾向が見られた。

3. 成熟期エナメル芽細胞では隣接する乳頭層ともに高濃度の Ca イオンが観察され、石灰化中のエナメル基質にも高濃度の Ca イオンが見られた。また、これらの細胞・組織中の Ca イオン分布は一様ではなく、乳頭層とエナメル芽細胞において高濃度の Ca イオンがみられるとき、エナメル基質では Ca 濃度は低く、またその逆の濃度分布のパターンの繰り返しが観察された。

考察：

エナメル質形成における Ca イオンの動態については、従来より Ca⁴⁵ を用いてのオートラジオグラフィ法により検討されてきた。Bawden らはエナメル芽細胞内の Ca シグナル伝達に関わる G プロテイン共役型レセプター、PI レスポンス、

PKC α の局在性を報告し、エナメル芽細胞内の Ca イオンのシグナル伝達を示唆してきている。最近、神経細胞、リンパ球、心筋、肝細胞などにおける Ca イメージングにより細胞の機能調節が詳細にされている。本研究では、医学各分野の Ca イメージング研究を参考にして、Ca 蛍光指示薬 FLUO-3 (エステル型) を用いて、ラット臼歯エナメル芽細胞における Ca イメージングを実現した。

本研究では、エナメル芽細胞内の Ca イオン濃度測定はできなかったが、Ca 蛍光指示薬の蛍光強度から、エナメル芽細胞内の Ca イオンは未分化期ではやや濃度は低く、分泌前期、分泌期では中程度、成熟期では濃度が高い傾向が見られた。エナメル質石灰化において大量の Ca イオンを必要とする成熟期では高濃度の Ca イオンがみられたことは、輸送としての Ca イオンが反映された結果と考えられる。一方、未分化・分泌前期における Ca イオンは細胞の増殖・分化に関わるシグナルのセカンドメッセンジャーとしての Ca イオンの局在が示唆される。分泌期エナメル芽細胞における Ca イオンは、基質タンパク分泌という重要な機能調節に関わるセカンドメッセンジャーであることが示唆された。また、この時期わずかな石灰化を伴うことから、Ca イオン輸送にも関わるということが考えられる。

成熟期のエナメル基質内に見られた Ca イオンは、石灰化中の遊離の Ca イオンが可視化された結果と理解される。成熟期エナメル芽細胞には細胞の遠心端が平坦な smooth-ended ameloblasts と刷子縁を持つ ruffle-ended ameloblasts との細胞集団が交互に繰り返し配列している。従来より、ruffle-ended ameloblasts では大量の Ca イオンがその刷子縁部から押し出されることが示唆されている。成熟期エナメル芽細胞と隣接する乳頭層との細胞集団と、石灰化中のエナメル基質の高濃度 Ca イオンの集団が一様ではなく、乳頭層とエナメル芽細胞において高濃度の Ca イオンがみられるとき、エナメル基質では Ca 濃度は低く、またその逆の濃度分布のパターンの繰り返しを観察された。これらの所見は smooth-ended ameloblasts と刷子縁を持つ ruffle-ended ameloblasts との細胞集団が交互に繰り返し配列していることに基づいた結果であることが考えられた。

本研究において、エナメル芽細胞における Ca イオンの輸送と調節機構の研究の一部として、Ca イオンイメージングを実現した。今後、その調節機構に関わるイノシトール 3 リン酸レセプターおよび Ca シグナル伝達に関わる Ca 結合タンパク (Calmodulin, Calbindin, Ca-ATPase) の局在について、追加検討予定である。

参考文献：

- 1：須田立雄、小澤英浩、高橋栄明。骨の科学。
- 2：小島 至。カルシウムのシグナル伝達機構。
- 3：Bawden,J.M.:Anat Rec,224:226.1998.
- 4：Nagai,N.,and Frank ,R.M.:Transfert du ^{45}Ca par autoradiographie en microscopie electronique au cours de Pame logenese, Calcif Tiss Res 19:211-221,1975.
- 5：Bawden and Alf Wennberg.:In Vitro Study of Cellular Influence on ^{45}Ca Uptake in Developing Rat Enamel,J Dent Res March Vol.56 No.3 313-319,1977.
- 6：川原茂敬、井上 剛、桐野 豊。神経細胞におけるカルシウムイメージング。細胞 30 (1),7-10 1998.
- 7：古野忠秀、中西 守。リンパ球におけるカルシウムイメージング。細胞 30 (1),11-14 1998.
- 8：横山慶一、松下 努、小山田正人、高松哲朗。心筋におけるカルシウム。細胞 30 (1),15-18 1998.
- 9：北村庸雄、渡辺純夫、佐藤信紘。肝細胞におけるカルシウムイメージング。細胞 30 (1),19-22 1998.
- 10：古家喜四夫、細胞間情報伝達を担う Ca、蛋白質核酸酵素 Vol43,No121547-54.
- 11：武藤 彩、御子柴克彦、細胞分裂に伴う Ca 動態、蛋白質核酸酵素 。 Vol43.No121829-33.