

最近のトピックス

歯髄の発生・再生過程における低分子熱ショック蛋白Hsp25の機能的意義 The functional significance of heat shock protein (Hsp) 25 during dental pulp development and regeneration

新潟大学大学院医歯学総合研究科
顎顔面再建学講座 硬組織形態学分野
大島 勇人

Div. of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue
Dept. of Tissue Regeneration and Reconstruction
Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
Hayato Ohshima

1. はじめに

酵母や大腸菌から哺乳動物細胞に至るまで、生物が高温など危険な環境に曝されると生合成が著しく促進される一群の蛋白が存在する。「熱ショック蛋白 heat shock protein (Hsp)」と命名されているこの蛋白分子は、ストレスによる損傷からの防御と修復に関与することが知られている。ストレスには温熱以外にも有害毒性物質、病態生理学的ストレスも含まれるので、現在では「ストレス蛋白」と呼ぶ研究者が多い。1980年代から分子生物学的研究によりHspの機能解析が進み、その役割が次第に明らかになっており、最近では免疫反応への関与も報告されている。

本稿では、これまで歯科領域では殆ど注目されてこなかった低分子量の熱ショック蛋白Hsp25（齧歯類では分子量25,000なのでHsp25と呼び、ヒトでは相同蛋白が分子量27,000なのでHsp27と呼ぶ）に着目し、我々の最近の研究により得たデータをもとに歯髄の発生・再生過程におけるその機能的意義についての仮説を紹介する。

2. Hspの機能について

生物にとって、温度、圧力、放射線、紫外線、重金属イオン、低酸素、pHの変化などの外部環境の急激な変化はしばしばストレスとして作用し、生物はこれらのストレスに対し細胞レベルで様々な方法で対処する。このような生体の反応をストレス応答と言い、その中心をなすのがHspの発現である。Hspはまた、自己免疫疾患

（慢性関節リウマチ等）、虚血性疾患（脳梗塞、心筋梗塞等）および癌などの疾患の発症およびそれに対する防御に関与すると考えられている。

Hspは多機能をもつ蛋白であるが、その主要な機能としてシャペロン機能が知られている。これはストレスにより誤って折り畳まれた蛋白を元どりの正しい立体構造に折り畳み直すことである。低分子熱ショック蛋白であるHsp25は、このシャペロン機能の他に、アクチンフィラメントの安定性やアポトーシスの抑制への関与が知られている。また、ある器官発生・細胞分化過程で一過性にHsp25が発現することが報告されている。しかしながら、口腔領域における低分子Hspの研究は立ち遅れており、Hsp27がヒト象牙芽細胞に発現するという報告が1編あるだけであった。

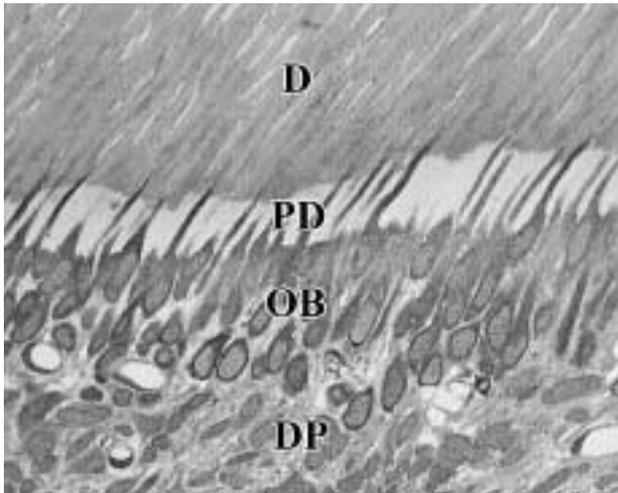
3. 歯髄の発生過程におけるHsp25の機能的意義

齧歯類切歯は常生歯であり、1本の歯をその形成端（常生歯は無根歯とも言われ、切歯では臼歯の根尖端に相当する部位をこのように呼ぶ）から切縁までを順次観察すると、エナメル質形成および象牙質形成のすべてのステージを観察することができる。そこで、ラット切歯の形成過程の各ステージにおけるHsp25発現について検索してみると、象牙芽細胞とエナメル芽細胞が特異的に同蛋白を発現していることが明らかとなった¹⁾。

エナメル質形成におけるHsp25発現については本稿の主題ではないので詳細は省略するが、象牙質形成過程において、象牙芽細胞は分化の進行と共にHsp25強陽性を示すようになったのに対し、歯髄間葉細胞は分化の進行と共にHsp25発現が減弱した。また、Hsp25強陽性を示すエナメル芽細胞と象牙芽細胞の共通点は、アクチンフィラメントを発達させていること、細胞層を維持し後退しながら基質を分泌することである。このことはHsp25発現がエナメル質形成ならびに象牙質形成における形成細胞移動時の細胞配列の維持に関与すると推測された。

つぎに生後1日から100日までのラット上顎第1臼歯を用いて、有根歯の歯髄におけるHsp25の分布を検索してみると、さらに面白いデータを得た²⁾。歯髄間葉細胞が一過性にHsp25陽性を示すこと、象牙芽細胞が分化の進行と共にHsp25強陽性を示すようになることはラット切歯のデータと同じ結果であったが、象牙芽細胞の分泌活性が低下する8週以降においても歯冠部象牙芽細胞は持続してHsp25強陽性を示した（図参照）。一方、髓床底部及び歯根部については、歯根形成期に歯髄全体が

一過性にHsp25陽性を示し、その後象牙芽細胞を含め陽性反応は減弱したが、生後100日になるとすべての象牙芽細胞がHsp25強陽性を示した。以上の様に、Hsp25発現は象牙芽細胞の分化に密接に関与することが明らかとなったが、必ずしも細胞の分泌活性とは一致しなかった。歯冠部と歯根部における象牙芽細胞のHsp25発現の違いは、時期により歯冠部と歯根部で象牙芽細胞の分化程度、機能発現に差があることも考えられた。



図．ラット臼歯象牙芽細胞（OB）におけるHsp25発現。
D: dentin, DP: dental pulp, PD: predentin

4．歯髄再生過程におけるHsp25の機能的意義

以上の様に、象牙芽細胞がHsp25強陽性を示すことは、歯牙侵襲後の歯髄再生過程を検索する際に、同蛋白発現が象牙芽細胞の分化マーカーとして利用できる可能性が示されたと言えよう。以下、ラット臼歯を用いた歯牙再植ならびに歯科用タービンによる歯牙切削（窩洞形成）実験により得たデータを紹介する^{3),4)}。

歯牙再植・移植は歯科臨床でも広く応用されており、根尖孔の開いた根未完成歯の場合は歯髄が再生することが知られている。歯髄の治癒様式は歯髄腔に修復象牙質が形成される場合と骨様組織に置換される場合、もしくは両者の混在型の3つのパターンが知られている。歯牙再植後の歯髄におけるHsp25の発現をみると、Hsp25強陽性を示す象牙芽細胞は再植後の血行の遮断により、1日後にはHsp25発現を失い、血行が回復する再植後5日後までに、複数の突起をもつHsp25強陽性の細胞が歯髄・象牙境に配列し、その後多量の修復象牙質形成が見られた。一方、骨様組織置換群では、歯髄・象牙境にHsp25陽性細胞が観察されなかった。

以上の結果より、Hsp25が再植後の再生象牙芽細胞に特異的に発現することが示され、歯髄間葉細胞の象牙芽

細胞への最終分化にHsp25が重要な役割を果たすことが示された。すなわち、歯髄・象牙境にHsp25強陽性細胞が配列することが修復象牙質形成の起点になることになり、歯髄変性後の治癒過程の決定にHsp25発現が重要な役割を果たすことが示された。

次に、窩洞形成後の歯髄再生過程におけるHsp25発現について紹介する。窩洞形成は傷害を受けた象牙芽細胞と象牙前質間に滲出性変化を惹起する。傷害を受けた象牙芽細胞はHsp25免疫陽性を持続していたが、12時間後までに歯髄・象牙境のHsp25免疫反応は消失した。しかしながら、傷害を受けた部位の歯髄・象牙境から離れている部位では、明らかな細胞突起をもたない円形の細胞がHsp25免疫陽性を維持していた。この陽性細胞の存在は細胞極性が失われているものの窩洞形成後も象牙芽細胞が生存していることを意味すると思われ、72時間後には、新しく分化した象牙芽細胞が歯髄・象牙境に配列し、Hsp25免疫陽性を示した。以上の様に、窩洞形成においてもHsp25免疫反応が歯髄の再生過程における象牙芽細胞の動態を観察するのに優れたマーカーとして利用できることが明らかになった。

窩洞形成12時間後において、細胞突起をもたないHsp25免疫陽性細胞が滲出性変化の部位の周囲に残存していることは興味深い。このことは、ほとんどの象牙芽細胞は窩洞形成により傷害をうけるが、あるものは変性とマクロファージによる貪食を逃れ生存していることを示している。象牙芽細胞の分化マーカーとしてHsp25発現を検索することにより、象牙芽細胞の運命が明らかになったと言えよう。

最近、Hspの炎症反応における新たな機能が注目を浴びている。腫瘍細胞への低酸素、放射線、化学療法によるストレスは細胞内Hsp蛋白の増加を促し、腫瘍細胞の死は周囲の多形核白血球を活性化し抗原提示細胞の遊走を惹起する。したがって、象牙芽細胞における高濃度のHsp25蛋白は、象牙芽細胞の破壊後に迅速な抗原提示細胞の遊走を促し、歯髄の治癒に重要な役割を担っているのかもしれない。窩洞形成や歯牙再植後の歯髄再生過程において、歯髄・象牙境に抗原提示細胞が一過性に出現することが明らかになっており^{5),6)}、Hsp25蛋白と抗原提示細胞の相互作用が歯髄侵襲後の迅速な象牙芽細胞分化に一役を担っているのかもしれない。言い換えれば、高濃度のHsp25蛋白をもった象牙芽細胞を備えた歯髄は免疫防御機能が高い組織だと言えるであろう。

5．おわりに

以上の様に、Hsp25蛋白分子は多機能であり、歯髄の発生・再生過程におけるその役割について、細胞分化と機能発現への関与、アクチンフィラメントとの相関、炎

症との関わりなどが推測されるに至ったが、未だ直接的な証明がなされていないのが現状である。しかし、象牙芽細胞が高濃度にHsp25蛋白を持つという事実は、細胞内もしくは組織内で起こっているイベントにHsp25蛋白が深く関与していることを示していると言えよう。歯髄におけるHsp25の機能的意義の解明のために今後さらに研究を進展させていきたい。

参考文献

- 1) Ohshima, H., Ajima, H., Kawano, Y., Nozawa-Inoue, K., Wakisaka, S. and Maeda, T. : Transient expression of heat shock protein (Hsp) 25 in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat incisor. Arch. Histol. Cytol. 63(4), : 381-395, 2000.
- 2) Ohshima, H., Nakakura-Ohshima, K. and Maeda, T.: Expression of heat-shock protein 25 immunoreactivity in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat molar. Connect. Tissue Res., 43(1-2) , 2002. in press
- 3) Ohshima, H., Nakakura-Ohshima, K., Yamamoto, H. and Maeda, T. : Alteration in the expression of heat shock protein (Hsp) 25-immunoreactivity in the dental pulp of rat molars following tooth replantation. Arch. Histol. Cytol., 64(4) : 425-437, 2001.
- 4) Ohshima, H., Nakakura-Ohshima, K., Yamamoto, H. and Maeda, T.: Responses of odontoblasts to cavity preparation in rat molars as demonstrated by immunocytochemistry for heat shock protein (Hsp) 25. Arch. Histol. Cytol., 64(5) : 493-501, 2001.
- 5) Ohshima, H., Sato, O., Kawahara, I., Maeda, T. and Takano, Y. : Responses of immunocompetent cells to cavity preparation in rat molars: An immunohistochemical study using OX6-monoclonal antibody. Connect. Tissue Res., 32(1-4) : 303-311, 1995.
- 6) Shimizu, A., Nakakura-Ohshima, K., Noda, T., Maeda, T. and Ohshima, H. : Responses of immunocompetent cells in the dental pulp to replantation during the regeneration process in rat molars. Cell Tissue Res., 302(2) : 221-233, 2000.