

アメロゲニン点変異マウスの
エナメル芽細胞分化過程における
アメロゲニン結合タンパクの免疫組織学的検索

大多和 奈央子

福岡歯科大学 成長発達歯学講座 矯正歯科学分野

Immunohistochemical study of amelogenin binding proteins in
amelogenin point mutation mouse during amelogenesis

Naoko Otawa

Section of Orthodontics,
Department of Oral Growth and Development,
Fukuoka Dental College

はじめに

本論文は、下記の参考論文を主とする参考論文とし、この参考論文を改変し図 3,5-10 として転用した。また未発表データとして図 4, 11, 12 および表 1, 2 を追加し、テーシス形式とした。

参考論文

題名 Immunohistochemical Study of Amelogenin Binding Proteins in an Amelogenin Point Mutation Mouse

掲載誌名 International Journal of Morphology

発行年月 June, 2019

著者名 Naoko Otawa-Kamogashira, Yuko Matsuda, Masaaki Takezaki, Yuji Hatakeyama, Sachio Tamaoki, Hiroyuki Ishikawa

目 次

1. 要 旨	1
2. 緒 言	2
3. 材料と方法	9
4. 結 果	11
5. 考 察	25
6. 謝 辞	28
7. 参考文献	29

1. 要 旨

アメロゲニン、エナメル芽細胞により分泌されるエナメルタンパクの一つで、その遺伝子変異はエナメル質形成不全を引き起こすことが知られている。Grp78、LAMP-1 および LAMP-3 はアメロゲニンに結合するタンパクであり、近年これらの結合タンパクは、正常または異常な状態におけるエナメル芽細胞の細胞動態に関与することが報告されている。そこで本研究の目的は、アメロゲニン点変異マウスを用いて、エナメル芽細胞の各分化段階におけるこれらのアメロゲニン結合タンパクの局在とエナメル質形成との関連を検討することにある。肉眼的所見により点変異マウスの切歯は白濁を呈し、粗造な歯面が走査型電子顕微鏡の観察で認められた。切歯における連続的なエナメル芽細胞の細胞分化段階において、10 週齢の点変異マウスの移行期エナメル芽細胞の配列は野生型マウスに比べて不規則であった。Grp78、LAMP-1 および LAMP-3 抗体を用いた免疫組織学的検索の結果、野生型マウスでは移行期エナメル芽細胞の遠位細胞質に陽性反応を認めたのに対して、点変異マウスでは細胞質全体に陽性反応を認めた。アメロゲニンは野生型マウスの移行期エナメル芽細胞にはほとんど陽性反応はみられなかったが、点変異マウスでは細胞質全体にみられた。また、Caspase 3 および Caspase 9 は、野生型では移行期エナメル芽細胞に陽性反応を認めなかったのに対し、点変異マウスでは陽性反応を認めた。アポトーシスを引き起こすような小胞体ストレスで Grp78 の発現が上昇すること、LAMP-1 および LAMP-3 はアメロゲニンの細胞内輸送または、細胞内取り込みに関与することが報告されている。以上のことからアメロゲニン遺伝子の点変異は、変異アメロゲニンタンパクの細胞内輸送または細胞内取り込みの異常により小胞体ストレスが移行期エナメル芽細胞で引き起こされ、その結果、エナメル芽細胞のアポトーシスが誘導されてエナメル芽細胞の連続的分化配列に乱れを生じることで、エナメル質形成不全となる可能性が考えられた。

2. 緒言

2-1. 歯の発生

ヒトにおける歯の発生は胎生6週ごろから始まるが、乳歯の萌出は出生後であること、また乳歯から永久歯に歯の交換が一度行われる二生歯性であることから、歯の発生過程は胎生期から生後まで長期にわたる。歯の発生過程において歯の原基となる組織を歯胚という。歯胚はその形態分化と組織分化段階により大きく4つに分けられ、それぞれ形成期、蕾状期、帽状期、および鐘状期とよばれる。これらの4つの段階は連続的に変化する。胎生6週ごろに上皮は肥厚し歯堤を形成し、歯堤の一部が肥厚、増殖することにより歯蕾を形成する。この時期は蕾状期とよばれ、さらに歯蕾周囲に間葉細胞が凝集し蕾状期歯胚となる。歯蕾はさらに増殖分化によって、帽子状または杯状のエナメル器となり、また凝集した間葉細胞はエナメル器内側に包まれ凝集した間葉細胞の歯乳頭、さらにこれらを歯小嚢が包み込む。この時期を帽状期という。エナメル器を構成するのは、帽子状のエナメル器の外側に位置する外エナメル上皮、歯乳頭と接する内エナメル上皮、そして内外エナメル上皮の間に位置する星状網である。歯胚は、外胚葉由来の歯原性上皮から生じるエナメル器、間葉細胞が凝集して生じる歯乳頭、およびこれらを包む間葉性の歯小嚢から構成される。歯乳頭および歯小嚢の間葉細胞は頭部神経堤細胞に由来する外胚葉性間葉細胞である。エナメル器からエナメル芽細胞 (ameloblast) が分化しエナメル質を、歯乳頭から象牙芽細胞が分化し象牙質を、さらに歯小嚢からセメント芽細胞、歯根膜線維芽細胞、および骨芽細胞が分化し、それぞれセメント質、歯根膜、および歯槽骨の一部を形成する¹⁾。

2-2. エナメル芽細胞

帽状期歯胚のエナメル器では内外エナメル上皮の移行部が増殖進展するためにエナメル器の陥凹が深くなるとともに歯胚が大きくなる結果、釣り鐘状の形態を呈するようになる。この時期を鐘状期と呼ぶ。鐘状期後期において内エナメル上皮からエナメル質を形成するエナメル芽細胞が分化する。エナメル芽細胞に分化する前の内エナメル上皮は立方形の形態を示し、細胞核は細胞質の中央にみられる。鐘状期のエナメル器は歯乳頭側より内エナメル上皮、中間層、星状網、外エナメル上皮から構成されるが、エナメル芽細胞のゴルジ装置が遠位細胞質に認められるとされ、その他の細胞小器官であるリボソーム、粗面小胞体、ライソゾーム等のごくわずかしが存在しない。エナメル芽細胞、および象牙芽細胞によるエナメル質形成および象牙質形成、さらにこれらの細胞分化は内エナメル上皮および歯乳頭間葉細胞の相互作用、すなわち上皮間葉相互作用により行われる。エナメル芽細胞の分化過程はエナメル質の形成過程により、内エナメル上皮 (inner enamel epithelium) 期、前エナメル芽細胞 (preameloblast) 期 (分化期)、基質形成期 (分泌期、

secretory stage)、移行期 (transition stage)、成熟期 (maturation stage)、退縮期 (post maturation stage) にわけられる (図 1)。前エナメル芽細胞は細胞の背が高くなり、基底細胞膜に複数の陥入が認められ、基底膜の断裂が始まる (図 1)。また核は近位側 (中間層側) に移動し、基底面側の細胞質、すなわち遠位細胞質では小胞体、ミトコンドリア、およびゴルジ装置が多く配置される (図 1)。基質形成期では細胞の背がさらに高くなり、高円柱状の細胞外形を呈するようになる (図 1)。分泌面には形成面と滑走面からなるトームス突起が出現し、明らかなエナメル基質の沈着が認められる。また核は細胞の近位部に位置し、遠位細胞質において複数のゴルジ装置、その周囲に粗面小胞体が見られる。さらに細胞質全体にはリボソームが散在する。エナメル基質形成が終了に近づくトームス突起の消失による細胞形態の変化、およびいくつかのエナメル芽細胞のアポトーシスがおこる

図 1

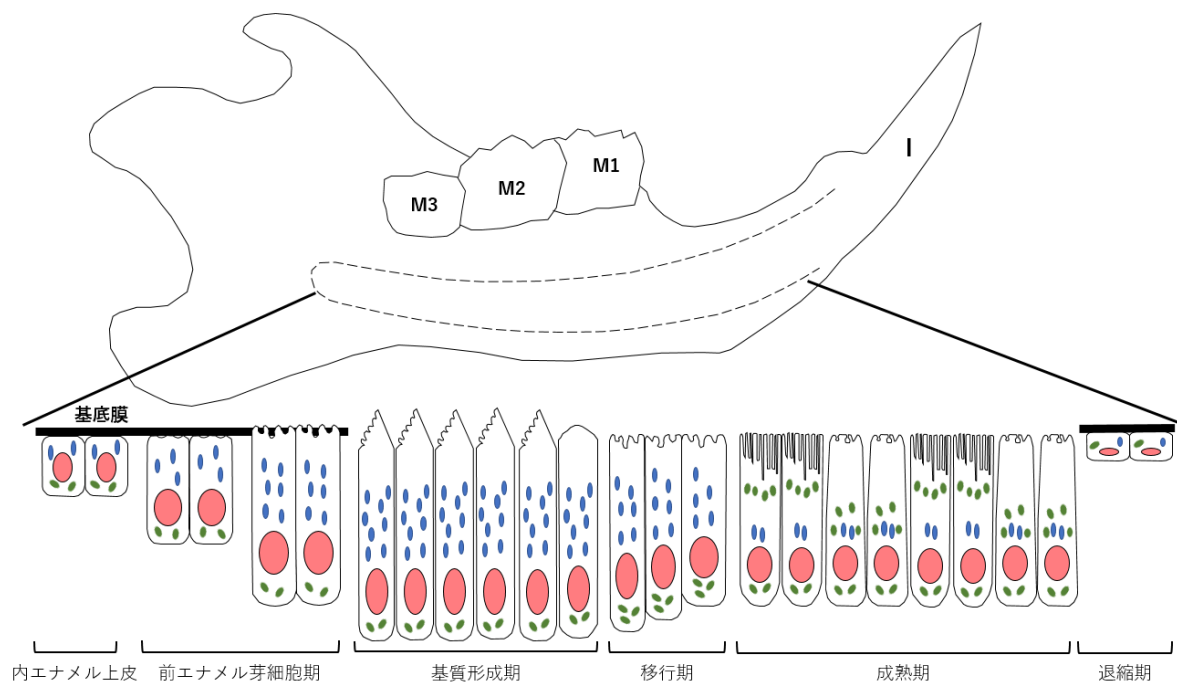


図1. マウス下顎骨および下顎切歯のエナメル芽細胞分化過程

本研究は野生型および点変異マウス下顎切歯におけるエナメル芽細胞を研究対象とした。下顎臼歯(M1-M3)の下方の下顎骨内に形成中の下顎切歯(I)が存在し、下顎切歯に接して各細胞分化段階のエナメル芽細胞が認められる。エナメル芽細胞の細胞核(緋色)は細胞分化とともに近位側に移動する。またミトコンドリア(緑色)およびゴルジ体(青色)の細胞内局在も変化する。

Bartlett JD. ISRN Dent. 2013: 684607, 2013.より改変

移行期となる (図 1)。成熟期は有機性基質が減少しエナメル質が高度に石灰化する時期であるが、エナメル芽細胞は2つの細胞型、すなわち 波状縁のある ruffle-ended ameloblast (RA)、および波状縁のない smooth-ended ameloblast (SA)が周期的に交互に出現する (図 1)。退縮期ではエナメル芽細胞の高さが急激に減少し、退縮エナメル上皮となる (図 1)。退縮エナメル上皮は歯の萌出までエナメル質の表層に残り縮合エナメル上皮ともよばれる。さらに歯の萌出後、歯頸部に残った退縮エナメル上皮は接合上皮になる³⁾。

2-3. エナメル質

ヒトにみられる硬組織には、エナメル質、象牙質、セメント質、および骨の4つがあるが、エナメル質は他の硬組織と比較して高度に石灰化された組織である。基質形成期のエナメル芽細胞はこれらのエナメルタンパクを産生分泌し、成熟期において分解および脱却されると同時にエナメル質の石灰化度が急激に上昇する。したがって、エナメル質の形成過程は基質形成と結晶化が進行する成熟期の2段階に分けられる。これらの形成過程は歯の萌出前に行われるため、萌出した歯のエナメル質は無機質含有率が95-97%である高度に石灰化された組織であるとともに、有機性基質は0.7-1.0%である²⁾。エナメル芽細胞が分泌するエナメルタンパクは アメロゲニン (Amelogenin)、アメロブラスチン (Ameloblastin)、エナメルリン (Enamelin)、別名、タフテリン (Tuftelin)、が知られてきた³⁾。また odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM)⁴⁾、アメロチン (amelotin)⁵⁾がエナメルタンパクとして報告されている。アメロゲニンは脊椎動物の種を越えて高度に保存された遺伝子であり、エナメルタンパクの中で最も豊富にみられ、エナメル質形成に重要な役割を果たす³⁾。ヒトにおいて、アメロゲニン遺伝子はX染色体 (Amelx) およびY染色体 (Amely) の両方に存在するが、それぞれの染色体から転写される mRNA 量はX染色体とY染色体では異なり、ヒト男性アメロゲニンの mRNA 量の約90%はX染色体からであるとされている⁶⁾。マウスにおいてアメロゲニン遺伝子は1つのX染色体のみから転写され、Y染色体にはみられない⁷⁾。マウスアメロゲニン遺伝子発現制御に関わる転写因子はこれまでいくつか報告があり、Msx²⁸⁾、C/EBP α ⁹⁾、NF-Y¹⁰⁾、C/EBP Δ ¹¹⁾、Dlx²¹²⁾、Dlx2 and FoxJ1¹³⁾、Oct-1¹⁴⁾、Pitx²¹⁵⁾、Clock genes¹⁶⁾、Nr1d1¹⁷⁾、Rux2 and Dlx3¹⁷⁾、Tbx1¹⁸⁾がある。Amelx 遺伝子は7つのエクソンから構成されるが、ヒトおよびげっ歯類においてエクソン8および9の存在が報告されている¹⁹⁾ (図 2(a))。すべてのエクソンより翻訳されるのはマウス 194 アミノ酸 (mouse 194 amino acid amelogenin)、すなわち M194 (full-length amelogenin) であるが、マウス Amelx から選択的スプライシングにより 16 種類の mRNA が知られており、多くみられるのがマウス 180 アミノ酸に翻訳される M180、およびマウス 59 アミノ酸、すなわち M59 (leucine-rich amelogenin protein (LRAP)) である²⁰⁾ (図 2(b))。これらのスプライシングアイソフォームの役割は不明であるが、アメロゲニンノックアウトマウスの解析からエナメル質の厚み、および結晶構造形成において M180 と LRAP が相互作用する可能性が報告されてい

る²¹⁾。前述のように成熟期においてエナメルタンパクが分解脱却されることにより急激に石灰化されるが、アメロゲニンはマトリックスメタロプロテアーゼ 20 (matrix metalloproteinase 20, MMP20)、エナメライシン (enamelysin) および カリクライン 4 (kallikrein 4) により分解される。MMP20 は基質形成期および成熟期初期において、またカリクライン 4 は移行期より成熟期においてエナメル芽細胞より分泌されアメロゲニンを分解し、調和のとれたエナメル質形成にアメロゲニンとともに重要な役割を果たす²⁴⁾。これらのアメロゲニン分解酵素によりアメロゲニンは断片化されるが、その分解物の一つに 45 アミノ酸のチロシンリッチアメロゲニンペプチド (tyrosine-rich amelogenin peptide, TRAP) がある²⁵⁾。本研究にて用いたアメロゲニン遺伝子点変異マウスは、M180 の分解産物である TRAP の tri-tyrosyl motif 相当遺伝子配列の C 末端に存在する 249 塩基部位のチミンがシトシンに点変異し、この点変異により、アミノ酸はチロシンがヒスチジンに変化している。過去の報告で、この点変異により TRAP の分解速度が落ちることが報告されている²⁶⁾。高度に石灰化されたエナメル質では、これらの断片化されたアメロゲニンがほとんど消失しているが、その機能および生理的意義については不明な点が多い²⁷⁾。

2-4. エナメル質形成不全症

エナメル質形成不全症は異なる遺伝子により全顎的または一部の歯におけるエナメル質形成に異常が起こる疾患である。その表現型は複合型など多様にわたるが、影響を受けるエナメル質の質と量に基づいて大きく 3 つに分けることができる²⁸⁾。すなわち低形成 (hypoplastic) 型、低成熟 (hypomaturation) 型、および低石灰化 (hypocalcified) 型である。低形成型はエナメル質の石灰化が正常型と概ね同程度であるが、その厚みが薄く、重症型ではエナメル質が消失している場合がある。低形成型は基質形成期における何らかの異常により引き起こされる形成不全である²⁸⁾。低成熟型はエナメル質の厚みは正常であるが、エナメルプロテインの分解脱却が不十分であることにより引き起こされ、石灰化が弱く、臨床的にはエックス線不透過性および歯の着色がみられることが特徴である²⁸⁾。低石灰化型は低成熟型と合わせて低無機化 (hypomineralized) 型に分類されることもあるが、低石灰化型はカルシウムイオン (Ca^{2+}) の供給が不十分なために引き起こされる²⁸⁾。エナメル質形成不全症を引き起こす原因遺伝子はエナメルタンパク遺伝子から見出され、アメロゲニン、アメロブラスチン、およびエナメリンが、またエナメルタンパク分解酵素である MMP20 およびカリクライン 4、転写因子の Dlx3 が報告されている²⁹⁾。また、ヒトにおいてアメロゲニンの点変異によりエナメル質形成不全症を発症する症例が報告されており³⁰⁾⁻³²⁾、M180 および TRAP に点変異を持つマウスにおいてエナメル質形成不全を示すことが報告されている^{33),34)}。エナメル質形成不全症の発症率は 8000 人から 14000 人に 1 人で、重症例では疼痛により摂食困難な例もあり、また審美的問題から患者の社会生活においても影響を与える²⁸⁾。またフッ素症など環境要因によるエナメル質形成不全が知られており、遺伝性エナメル質形成不全症との鑑別が重要である²⁸⁾とともに、遺伝子点変

異による機序解明が必要であると考えられる。

2-5. アメロゲニン結合タンパク

アメロゲニンは最も豊富にみられるエナメルタンパクであり、カルシウム結合およびタンパク間相互作用の結果、ナノ粒子 (nanospheres) 形成を促進しハイドロキシアパタイトの結晶成長を促進することによりエナメル質形成に重要な役割を果たす^{35), 36)}。近年、アメロゲニンが上皮由来のエナメル芽細胞のみならず、間葉由来細胞に発現し³⁷⁾⁻⁴¹⁾、間葉由来細胞の細胞動態に与える影響についての報告がなされている⁴²⁾⁻⁴⁸⁾。しかし、アメロゲニンが細胞膜表面のどの分子と結合し、どのようなシグナル伝達経路により細胞機能が誘導されるのかは不明な点が多い⁴⁹⁾。2005年にWangらはLysosome-associated membrane protein 3 (LAMP-3, CD63)⁵⁰⁾が、2006年にTompkinsらはlysosome-associated membrane protein 1 (LAMP-1)⁵¹⁾が細胞膜表面に発現しアメロゲニンと結合することを見出し、その後、これらが細胞動態に影響を与えることを報告している^{52), 53)}。LAMP-1はエンドソームおよびリソソーム、細胞膜に発現がみられる。特に細胞膜表面のLAMP-1はリソソーム輸送に関わる可能性があることより、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、およびファゴサイトーシスに重要な役割を果たすと考えられている^{54), 55)}。LAMP-3はテトラスパニンファミリーの一つで4回貫通型細胞膜タンパクであり、さまざまな細胞動態に関与する。またLAMP-1と同様に、細胞膜表面だけではなく、エンドソーム、リソソーム、および分泌小胞にもみられ、細胞内取り込みに関与すると考えられている^{55), 56)}。ヒトの内エナメル上皮では細胞膜表面のLAMP-1がLRAPと結合しエナメル上皮細胞の分化促進に関与することが報告されている⁵⁷⁾。またラットのエナメル芽細胞様細胞株ではLAMP-1がLRAPの特異的受容体として、LAMP-3がM180の細胞内取り込みに関与する可能性が報告されている⁵⁸⁾。しかしながら、これらのアメロゲニン結合タンパクがエナメル芽細胞の細胞動態に与える影響の詳細は不明である。

近年、full-length amelogeninを用いて、骨芽細胞の細胞質分画および細胞膜分画の両方からアメロゲニン結合タンパクとして見出されたのが78 kDa glucose-regulated protein (Grp78)である⁵⁸⁾。Grp78は熱ショックタンパク (heat shock protein) であるHsp70ファミリーの一つであり、binding immunoglobulin protein (BiP)、heat shock 70 kDa protein 5 (HSPA5)ともよばれている⁵⁹⁾。Grp78は小胞体の膜タンパクであり、タンパクの折りたたみ (protein folding) に関与する分子シャペロンである。また、細胞膜表面にも存在することが分かっており、小胞体ストレスのみならず、胚形成、ガン発生および進行において受容体として働き、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease) やパーキンソン病 (Parkinson's disease) の発症メカニズムに関与している⁶⁰⁾。マウス⁶¹⁾およびラット⁶²⁾エナメル芽細胞株においてフッ素濃度の上昇とともにGrp78遺伝子発現およびタンパク発現が上昇し、フッ素症との関連が報告されている。しかし、生体内でのエナメル芽細胞分化過程におけるGrp78の局在や機能については不明である。

2-6. 目的

本研究の目的は、エナメル質形成不全症の表現型を呈するアメロゲニン遺伝子点変異マウスを用いて、アメロゲニン結合タンパクである Grp78、LAMP-1 および LAMP-3 のエナメル芽細胞分化過程における局在を免疫組織学的分析で明らかにすることで、エナメル質の形成調節機構や形成不全の病態機序の理解を深めることである。

3. 材料と方法

3-1. エナメル質形成不全症モデルマウス

本研究で使用したマウスは、エナメル質形成不全症の表現型を示すヘミ接合型雌性マウス (D2;B6-Rgsc888/Rbrc (M100888)) および同一系統 (DBA/2J) 野生型雄性マウスの7組を RIKEN より購入した。本研究に使用したマウスはアメロゲニン遺伝子における M180 分解産物である TRAP に相当するアミノ酸配列をコードする領域に点変異があることはすでに報告済みであり⁶¹⁾、かつ購入対象となったマウスは購入前に RIKEN にて確認済みである。アメロゲニン遺伝子における点変異はエチルニトロソウレア (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) を変異原 (変異原性物質) として雄性マウスの腹腔内に注射され、正常型雌性マウスとの交配により出生したマウスをスクリーニングし、切歯にエナメル質形成不全症に類似の表現型を持つマウスから選別することにより作成されている⁶¹⁾。7組のマウスより出生した第一世代、またはその交配により出生した第二世代マウスの中で、切歯において最も顕著にエナメル質形成不全症を呈するヘミ接合型雄性マウス (以下、点変異マウス) を実験に供与した。また切歯において異状が認められない雄性マウスを野生型 (以下、野生型マウス) として比較した。

3-2. 走査型電子顕微鏡による観察

エナメル質表面の微細構造は走査型電子顕微鏡 (SEM) (JCM-6000 Plus, JEOL, Tokyo, Japan) にて観察した。12 週齢の野生型および点変異マウスの下顎骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液 (4% PFA-0.1M PBS、pH7.4) にて固定後、蒸留水で洗浄、および大気中で乾燥した。切歯はコーティング処理を行わずに、加速電圧 10.00kV の条件下で SEM にて観察し、二次電子検出器による画像を撮影した。

3-3. 固定、パラフィン包埋、切片作成、ヘマトキシリン-エオジン染色

10 週齢の野生型および点変異マウスを 4% PFA-0.1M PBS にて還流固定を行い、下顎骨を摘出後、同一固定液にて 24 時間浸漬固定を行った。その後、10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) -0.01 M PBS により 4 週間、低温 (4°C) 脱灰を行った。脱灰後、上昇エタノール系列にて脱水、キシレンにて置換後、パラフィンに包埋した後に、厚さ 4 μ m の連続パラフィン切片を作成した。パラフィン切片は通法に従いヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を施した。

3-4. 蛍光免疫染色

HE 染色を施した切片に近接するパラフィン切片を Amelogenin、LAMP-1、LAMP-3、Grp78、Caspase 3、および Caspase 9 抗体による蛍光免疫染色に供与した。

蛍光免疫染色に使用した一次抗体は、それぞれ、ウサギ抗マウスアメロゲニン抗体 (EMD Millipore, Temecula, CA, USA)、ウサギ抗マウス LAMP-1 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、ウサギ抗マウス LAMP-3 抗体 (Proteintech, Rosemont, IL, USA)、ウサギ抗マウス Grp78 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、ウサギ抗マウス Caspase 3 抗体 (Proteintech, Rosemont, IL, USA)、ウサギ抗マウス Caspase 9 抗体 (Proteintech, Rosemont, IL, USA) である。また、二次抗体は Alexa Fluor 594 ヤギ抗ウサギ抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いた。アメロゲニン抗体は、M57 を除いた全てのスプライシングアイソフォームを認識するアメロゲニン抗体を使用した。前述のパラフィン切片をキシレンおよび下降エタノール系列により処理し、蛍光免疫染色に用いた。LAMP-1 および LAMP-3 抗体を用いた免疫染色では、切片を 0.01M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 中で 98°C、20 分間処理して抗原賦活化を行った。アメロゲニン、Grp78、Caspase 3、および Caspase 9 抗体を用いた免疫染色では抗原賦活化処理を行わなかった。一次抗体は 4°C にて 24 時間インキュベーションを行い、PBS 洗浄後、二次抗体を室温 1 時間反応させた。PBS 洗浄後、各細胞分化段階にあるエナメル芽細胞の細胞膜、ゴルジ装置、およびトームス突起を可視化するために⁶³⁾⁻⁶⁶⁾、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 wheat germ agglutinin (WGA) レクチン (J-Chemical, Tokyo, Japan) を 10 分間室温にてインキュベーションを行った。また核染色は 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いた。画像取得は蛍光顕微鏡 (KEYENCE, 大阪府, 日本) で行った。

4. 結果

4-1. エナメル質表面形態

本研究の実験に供与したエナメル質形成不全症を呈するマウス切歯エナメル質表面形態を観察するために、12週齢における野生型および点変異マウスの下顎切歯をSEMにて観察した。SEMの観察に先立ち、肉眼的所見によりエナメル質の色調を確認した。その結果、野生型マウスでは褐色透明のエナメル質を呈していたのに対して(図3A)、点変異マウスにおいては白色チョーク様の色調を呈していた(図3B)。SEM像において野生型マウスでは滑沢な表面形状であったが(図3C, E)、点変異マウスではエナメル質表層が粗造で

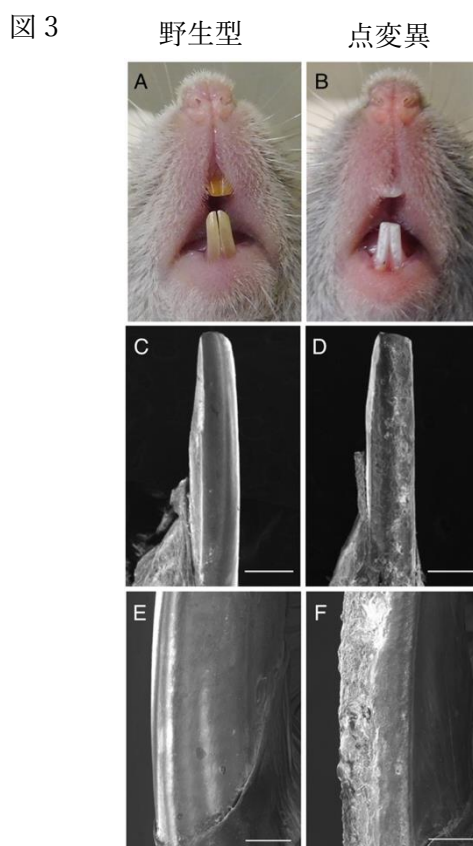


図3. 野生型および点変異マウスの下顎切歯の肉眼的所見およびエナメル質表面形態
野生型マウスの下顎切歯は淡褐色を示すのに対して(A)、点変異マウスはチョーク様白色を呈する(B)。走査型電子顕微鏡による観察では、野生型マウスの下顎切歯のエナメル質表面は滑沢であるのに対して(C, E)、点変異マウスは粗造である(D, F)。図中右下のスケールバーは、500 μm (C, D)、200 μm (E, F)を示す。

あった (図 3D, F)。このことから、アメロゲニン遺伝子点変異はヒトにおける低形成型エナメル質形成不全症に類似の表現型を示した。

4-2. HE 染色による形態学的検討

アメロゲニン結合タンパクの局在を検討する前に、HE 染色を施した 10 週齢の野生型および点変異マウスの組織学的構造の検討を行った。野生型マウスにおいて、下顎切歯に前エナメル芽細胞、基質形成期、移行期、成熟期の連続的な各分化段階のエナメル芽細胞が観察された (図 4, 図 5A-D)。点変異マウスにおいては、野生型マウスと比較しエナメル基質の厚みは薄く、エナメル芽細胞の分化の進行とともにエナメル芽細胞の配列の乱れを認めた (図 4)。次にエナメル芽細胞の分化段階で検討したところ、前エナメル芽細胞においては、細胞形態および細胞配列について野生型マウスと点変異マウスに違いは認められ

図 4

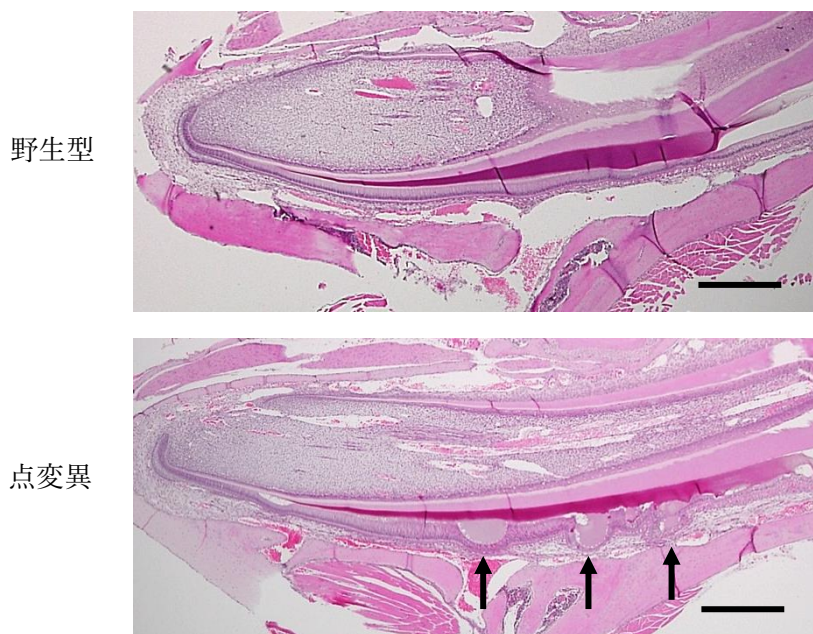


図 4. 野生型および点変異マウスの下顎切歯の組織学的形状

10 週齢における野生型および点変異マウスの下顎切歯のパラフィン切片に HE 染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。野生型マウスでは、頸係蹄より成熟期までエナメル芽細胞の規則的な細胞配列が認められる。一方、点変異マウスにおいては、ヘマトキシリン陽性のエナメル基質は野生型マウスと比較して薄く、エナメル芽細胞分化の進行とともにエナメル芽細胞配列の乱れやエナメル質の低形成が認められる (矢印)。図中のスケールバーは $500 \mu\text{m}$

なかった (図 5E)。前エナメル芽細胞より細胞の高さが高くなった基質形成期では、点変異マウスのエナメル芽細胞間に点状のヘマトキシリン陽性像を認めた (図 5F)。移行期エナメル芽細胞は、ヘマトキシリンに薄く染まるエナメル基質を取り囲むように乱れて配列していた (図 5G)。またエナメル芽細胞間、または細胞質にヘマトキシリン陽性の部分が認められた (図 5G)。成熟期において、野生型および点変異がみられるマウスのエナメル質領域は、石灰化された組織であるため、HE 染色を施した脱灰パラフィン切片では無染色またはわずかに染色されている領域となっていた (図 5D, H)。しかし、点変異マウスにおいて移行期と同様にエナメル芽細胞の屈曲した細胞配列の乱れとともに、一部においては細胞配列に取り囲まれるヘマトキシリン陽性の基質が観察された (図 5H)。これらの所見から、アメロゲン遺伝子における点変異は、前エナメル芽細胞の細胞配列に影響を与えないが、基質形成期、移行期および成熟期におけるエナメル基質形成の異常や、移行期におけるエナメル芽細胞の配列の乱れを引き起こすことが示された。

図 5

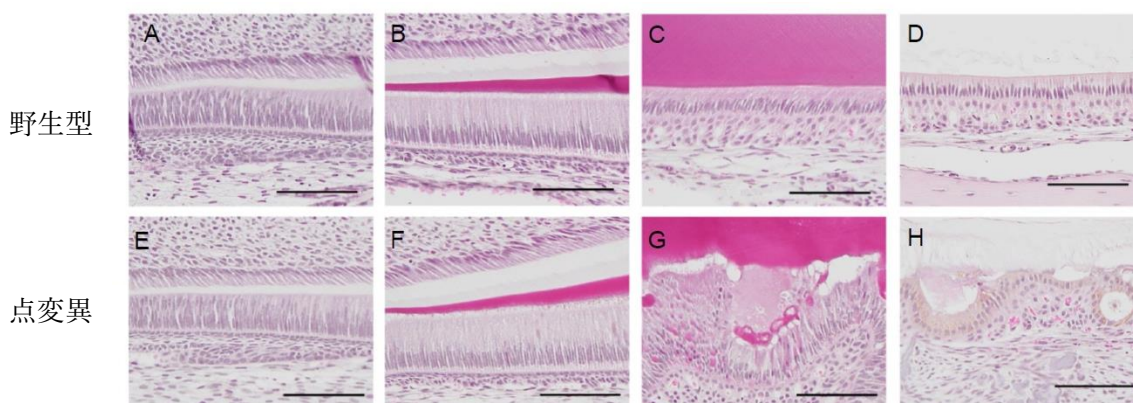


図 5. 野生型および点変異マウスの各エナメル芽細胞分化段階におけるエナメル芽細胞およびエナメル基質の組織学的形状

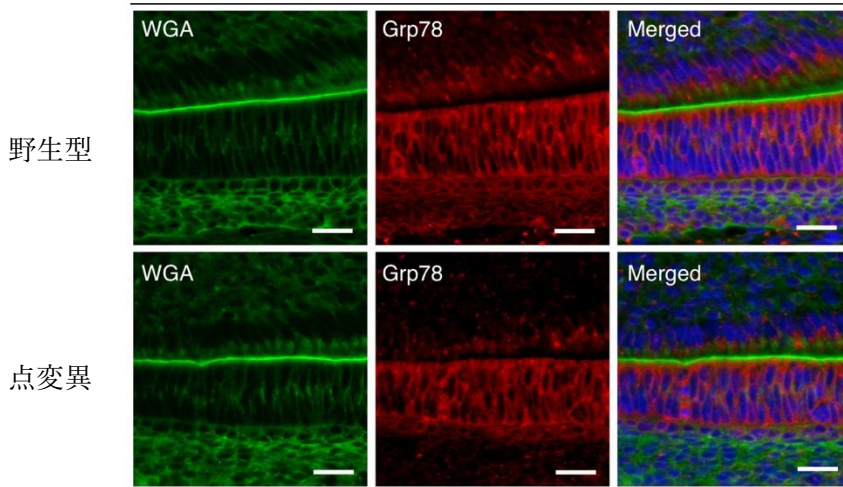
10 週齢における野生型および点変異マウスの下顎切歯のパラフィン切片に HE 染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。野生型マウスにおいて前エナメル芽細胞期(A)、基質形成期(B)、移行期(C)、および成熟期(D)エナメル芽細胞の正常な配列を認めた。一方、点変異マウスでは、基質形成期 (F) においては、エナメル芽細胞質に点状のヘマトキシリン陽性像を認め、移行期 (G) および成熟期(H)にヘマトキシリンに淡く染まるエナメル基質を取り囲むようなエナメル芽細胞の配列の異常を認めた。スケールバーは 100 μ m

4-3. Grp78 の局在

エナメル芽細胞の細胞膜を可視化するために WGA レクチン染色を行った。WGA レクチン染色により中間層および象牙芽細胞との境界が明らかとなり、野生型および点変異マウスの両方で、前エナメル芽細胞の細胞質全体に、Grp78 抗体に対する陽性反応が認められた (図 6)。また、基質形成期エナメル芽細胞においては、野生型および点変異マウスのいずれのエナメル芽細胞においても、核は近位へ移動した。基底面側の WGA 陽性反応が認められる領域の遠位細胞質の遠位部および近位部の領域の細胞質に、Grp78 抗体に対する陽性反応が認められた (図 6)。一方、野生型マウスの移行期エナメル芽細胞では遠位細胞質の WGA 陽性領域に挟まれるように遠位細胞質の中央部に Grp78 の陽性反応が認められた。それに対し、点変異マウスの移行期エナメル芽細胞においては WGA 陽性領域が認められないとともに細胞質全体に Grp78 抗体に対する陽性反応が認められた (図 7)。野生型マウスの成熟期エナメル芽細胞は、移行期エナメル芽細胞と同様の Grp78 抗体に対する陽性反応が認められた。点変異マウスの成熟期エナメル芽細胞では、移行期エナメル芽細胞と同様にエナメル芽細胞の細胞質全体に Grp78 抗体に対する陽性反応が認められた (図 7)。以上の結果より、野生型マウスでは、Grp78 はエナメル芽細胞の分化に伴って局在が変化することが分かった。前エナメル芽細胞期および基質形成期エナメル芽細胞における Grp78 の局在に野生型と点変異マウスの差は認められないが、移行期エナメル芽細胞および成熟期エナメル芽細胞においては野生型と点変異マウスに Grp78 の異なる局在を示した。

図 6

前エナメル芽細胞期



基質形成期

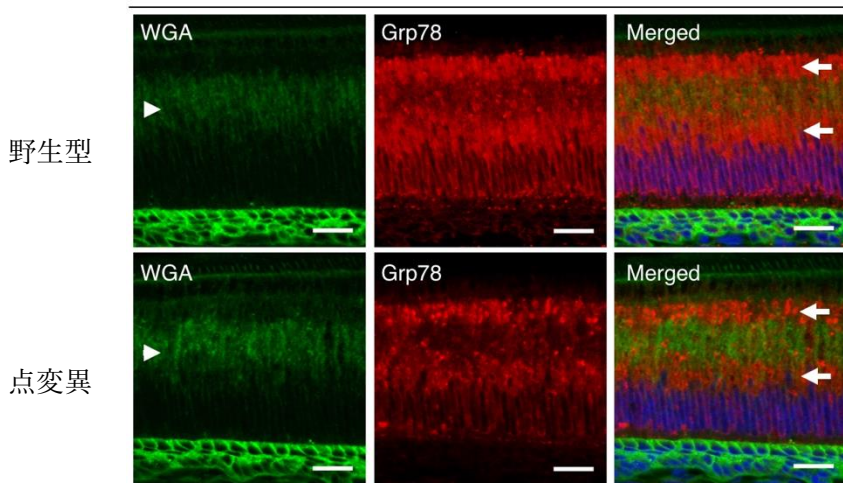
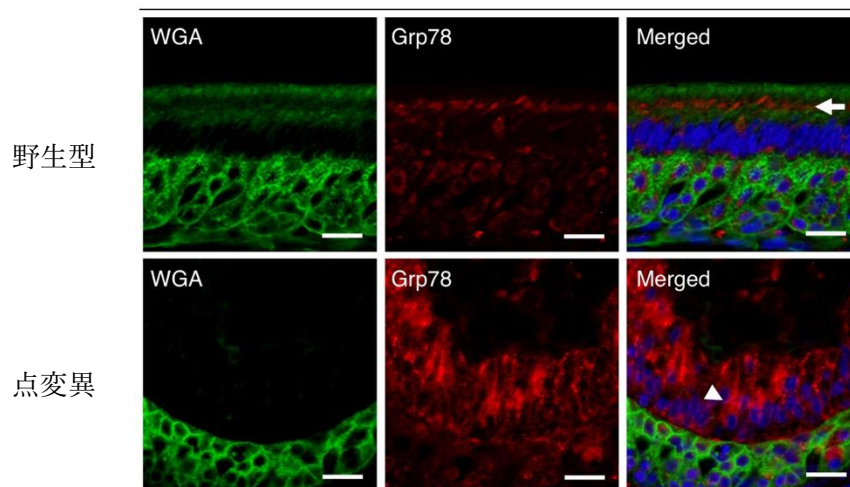


図 6. 前エナメル芽細胞期および基質形成期エナメル芽細胞における Grp78 の免疫組織学的局在

10 週齢における野生型および点変異マウスの下顎切歯における Grp78(赤)の免疫染色を示す。エナメル芽細胞の形態を WGA (緑) 染色で可視し、核を DAPI(青)にて染色を行った。野生型および点変異マウスの前エナメル芽細胞の細胞質全体に Grp78 の陽性反応を認めた。基質形成期においてエナメル芽細胞の遠位細胞質の中央部に WGA 陽性反応を認め (矢頭)、その近位部 (矢印) および遠位部 (矢印) に Grp78 の陽性反応を認めた。スケールバーは 20 μ m

図 7

移行期



成熟期

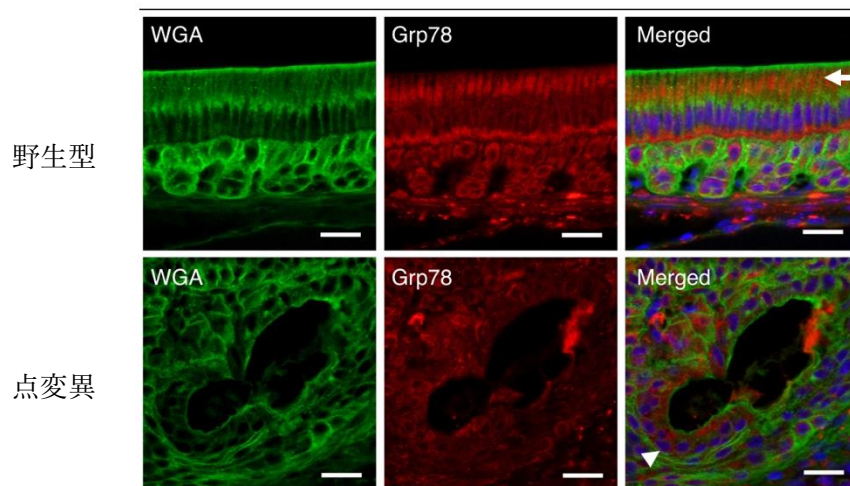


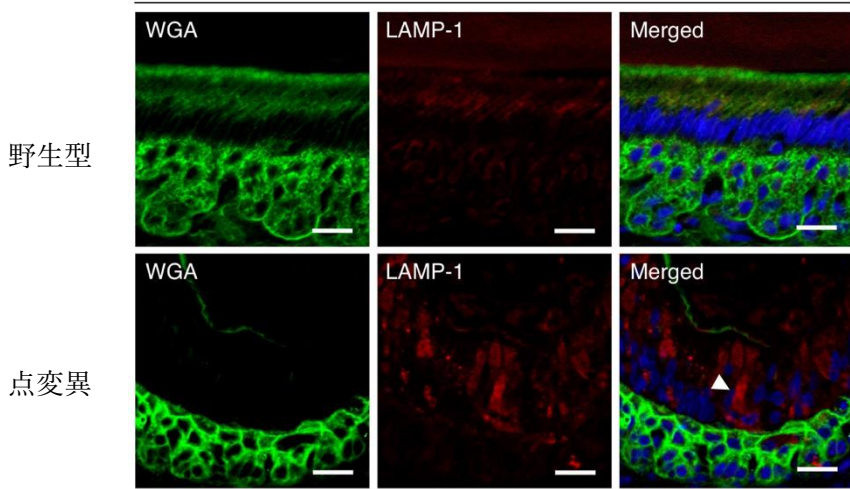
図 7. 移行期および成熟期エナメル芽細胞における Grp78 の免疫組織学的局在
 10 週齢における野生型および点変異マウスの下顎切歯における
 Grp78(赤)の免疫染色を示す。エナメル芽細胞の形態を WGA (緑) 染色
 で可視し、核を DAPI(青)にて染色を行った。野生型マウスの移行期およ
 び成熟期エナメル芽細胞においてエナメル芽細胞の遠位細胞質の中央部に
 Grp78 の陽性反応を認めた (矢印)。点変異マウスではエナメル芽細胞の
 移行期および成熟期においてエナメル芽細胞の細胞質全体に Grp78 の陽
 性反応を認めた (矢頭)。スケールバーは 20 μ m

4-4. LAMP-1 および LAMP-3 の局在

Grp78 の蛍光免疫染色と同様に WGA レクチン染色によりエナメル芽細胞と、中間層および象牙芽細胞との境界が明らかとなった (図 8, 9)。野生型および点変異マウスの両方において、前エナメル芽細胞における LAMP-1 抗体に対する陽性反応はほとんど認められなかった (図 8)。しかし、基質形成期エナメル芽細胞においては野生型および点変異マウスの両方で明らかな LAMP-1 抗体に対する陽性反応が認められた (図 8)。野生型マウスでは LAMP-1 抗体に対する点状の陽性反応が遠位細胞質の中央部でみられたが、点変異マウスでは、近位細胞質を含め細胞質の全体に点状の陽性反応が認められた (図 8)。この細胞質全体にみられた LAMP-1 抗体に対する陽性反応は、点変異マウスの移行期および成熟期エナメル芽細胞においても認められた (図 9)。一方、野生型マウスにおける移行期および成熟期エナメル芽細胞においてはエナメル芽細胞の遠位細胞質の近位部に陽性反応が認められた (図 9)。LAMP-3 抗体に対する陽性反応は、前エナメル芽細胞期、基質形成期、および成熟期エナメル芽細胞において野生型および点変異マウスともに非常に弱く、局在の差は認められなかった(データは示していない)。移行期エナメル芽細胞において、野生型マウスのエナメル芽細胞では遠位細胞質の中央部に細かい点状に LAMP-3 抗体に対する陽性反応が認められた。点変異マウスでは遠位細胞質に野生型と同じ細かい点状の陽性反応と、大きい斑状の陽性反応が認められた (図 10)。

図 9

移行期



成熟期

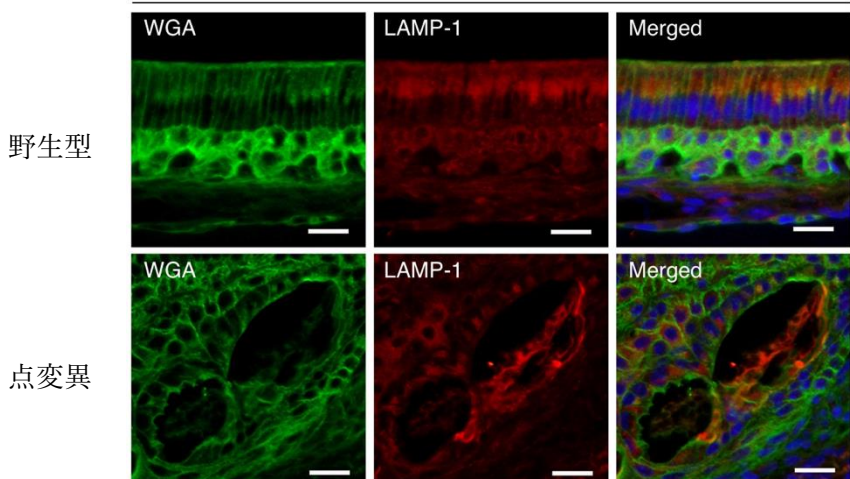


図 9. 移行期および成熟期エナメル芽細胞における LAMP-1 の免疫組織学的局在

10 週齢における野生型および点変異マウスの下顎切歯における LAMP-1(赤)の免疫染色を示す。エナメル芽細胞の形態を WGA (緑) 染色で可視し、核を DAPI(青)にて染色を行った。野生型マウスの移行期および成熟期エナメル芽細胞において遠位細胞質の近位部で陽性反応を認めたが、点変異マウスでは近位細胞質を含む細胞質全体に斑状の LAMP-1 の陽性反応を認めた (矢頭)。スケールバーは 20 μm

図 10

移行期

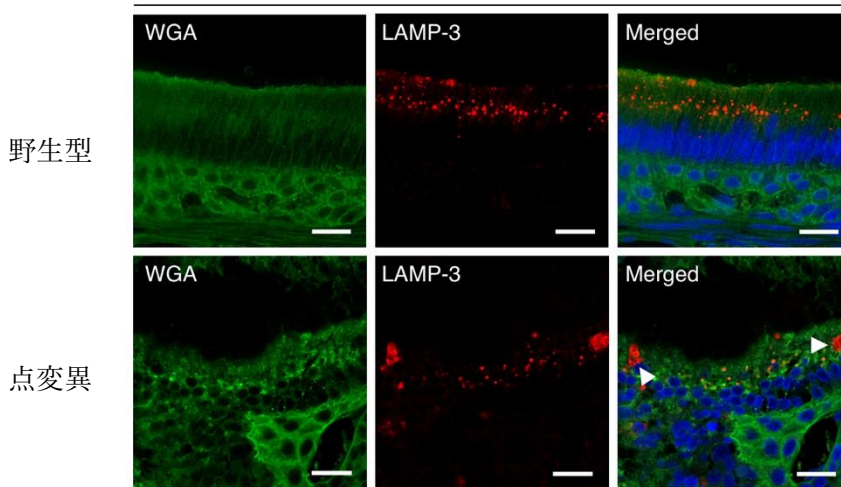


図 10. 移行期エナメル芽細胞における LAMP-3 の免疫組織学的局在

10 週齢における野生型および点変異マウスの下顎切歯における LAMP-3(赤)の免疫染色を示す。エナメル芽細胞の形態を WGA (緑) 染色で可視し、核を DAPI(青)にて染色を行った。野生型マウスの移行期エナメル芽細胞において、遠位細胞質の中央部に LAMP-3 の点状の陽性反応を認める。点変異マウスでは、遠位細胞質に小さい点状の陽性反応に加えて、斑状の LAMP-3 陽性反応も認める (矢頭)。スケールバーは 20 μ m

4-5. アメロゲニンの局在

アメロゲニン結合タンパクとして報告されている Grp78、LAMP-1、および LAMP-3 のそれぞれに対する抗体陽性反応は、野生型マウスと点変異マウスを比較して基質形成期以降の細胞分化段階において異なっていた。そこで、アメロゲニン抗体を用いた蛍光免疫染色を野生型および点変異マウスの基質形成期および移行期エナメル芽細胞に行った。その結果、野生型マウスの基質形成期ではエナメル芽細胞の遠位細胞質の遠位部に強い点状の陽性反応が認められたが、移行期ではアメロゲニン抗体に対する強い陽性反応は認められなかった (図 11)。一方、点変異マウスの基質形成期においては、野生型マウスと同様にエナメル基質にアメロゲニン抗体に対する強い陽性反応が認められたが、エナメル芽細胞の遠位細胞質の中央部においても大型の球状の陽性反応が認められた

(図 11)。また、点変異マウスの移行期においてはエナメル基質と同程度の強い陽性反応が細胞質全体に認められ、エナメル芽細胞の核周囲にも球状の反応を認めた (図 11)。以上のことから、野生型マウスと点変異マウスのエナメル芽細胞の基質形成期および移行期においてアメロゲニンの局在の違いを認めた。

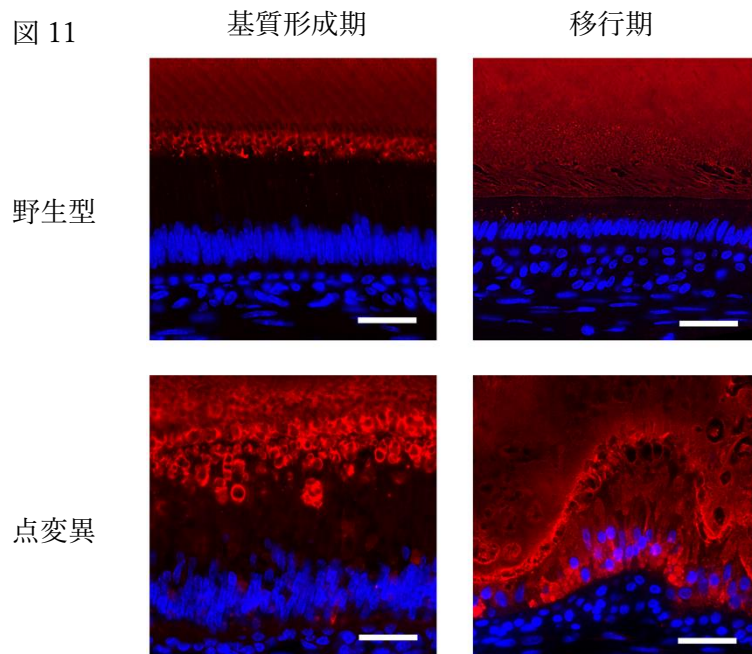


図 11. 基質形成期および移行期エナメル芽細胞におけるアメロゲニンの免疫組織学的局在

10 週齢における野生型および点変異マウスの下顎切歯におけるアメロゲニン(赤)の免疫染色を示す。核染色は DAPI(青)にて行った。野生型マウスの基質形成期において、遠位細胞質の遠位部に点状の陽性反応を認める。点変異マウスの基質形成期において、遠位細胞質の中間部および遠位部に野生型マウスと比較し大きい球状の陽性反応を認める。また、点変異マウスの移行期においては、エナメル芽細胞の細胞質全体に陽性反応を認め、近位および遠位細胞質の遠位部に球状の陽性反応を認める。スケールバーは 20 μm

4-6. Caspase 3、9 の局在

移行期エナメル芽細胞においてアポトーシスがみられること⁶¹⁾や、今回実験に用いたものと同じ点変異マウスを用いた過去の研究において、移行期エナメル芽細胞では Caspase 3 の抗体の陽性反応が報告されている⁶⁸⁾。そこで、Caspase 3 および Caspase 9 の抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。その結果、野生型マウスの移行期エナメル芽細胞では Caspase 3 および Caspase 9 の抗体に対する陽性反応は認められなかった (図 12)。一方、点変異マウスの移行期エナメル芽細胞においては Caspase 3 および Caspase 9 の両方

の抗体に対する陽性反応が認められた (図 12)。以上のことは、アメロゲニン遺伝子における点変異は過去の報告と同様に^{61)、68)}、移行期エナメル芽細胞において Caspase 3 および Caspase 9 の発現が上昇することが分かった。

これまでの免疫組織学的解析結果を、表 1, 2 にまとめる。

図 12

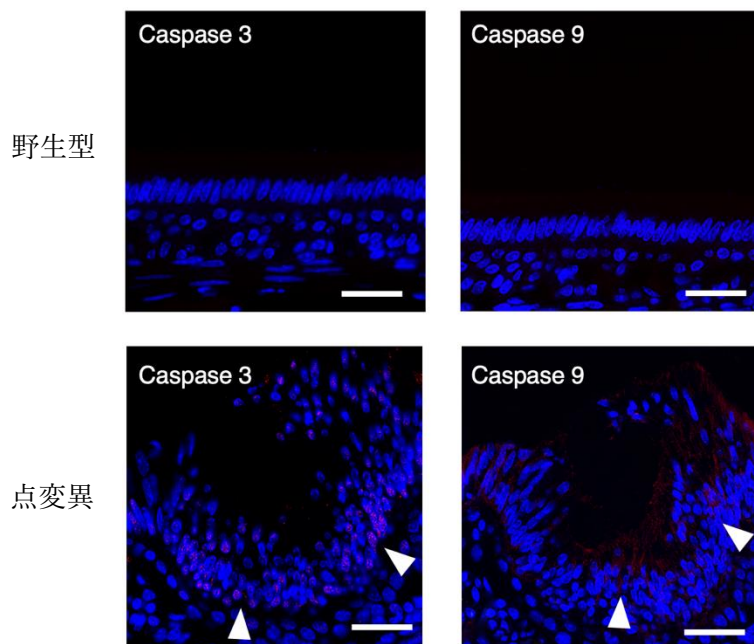


図 12. 移行期エナメル芽細胞における Caspase 3 および Caspase 9 の免疫組織学的局在

10 週齢における野生型および点変異マウスの下顎切歯における Caspase 3 および Caspase 9 (赤) の免疫染色を示す。核染色は DAPI (青) にて行った。野生型マウスの移行期エナメル芽細胞において、Caspase 3 および Caspase 9 の陽性反応は認められなかった。一方、点変異マウスの移行期エナメル芽細胞においては Caspase 3 および Caspase 9 の陽性反応を認めた (矢頭)。スケールバーは 20 μm

表1 エナメル芽細胞における Grp78、LAMP-1 および LAMP-3 の免疫染色陽性領域

Grp78	前エナメル芽細胞期	基質形成期	移行期	成熟期
野生型	細胞質全体	遠位細胞質の遠位部・近位部 (WGA の両端)	遠位細胞質の中央部	遠位細胞質の中央部から近位細胞質
点変異	細胞質全体	遠位細胞質の遠位部・近位部	細胞質全体	細胞質全体

LAMP-1	前エナメル芽細胞期	基質形成期	移行期	成熟期
野生型	認めない	遠位細胞質の中央部	遠位細胞質の中央から近位部	遠位細胞質の近位部
点変異	認めない	細胞質全体	細胞質全体 (斑状)	細胞質全体 (斑状)

LAMP-3	前エナメル芽細胞期	基質形成期	移行期	成熟期
野生型	非常に弱い	非常に弱い	遠位細胞質の中央部 (点状)	非常に弱い
点変異	非常に弱い	非常に弱い	細胞質全体 (点状、斑状)	非常に弱い

表2 エナメル芽細胞におけるアメロゲニン、Caspase 3 および Caspase 9 の免疫染色陽性領域

アメロゲニン	基質形成期	移行期
野生型	遠位細胞質の遠位部 (点状)	遠位細胞質 (非常に弱い)
点変異	遠位細胞質の中央から遠位部 (球状)	細胞質全体 (近位細胞質および遠位細胞質遠位部では球状)

Caspase 3	移行期
野生型	陽性反応を認めない
点変異	陽性反応を認める

Caspase 9	移行期
野生型	陽性反応を認めない
点変異	陽性反応を認める

5. 考 察

アメロゲニン是最も豊富なエナメル質の有機性成分で、エナメル質のハイドロキシアパタイト結晶化制御によりエナメル質の石灰化と厚みに重要な役割を果たす³⁾。エナメル質形成不全症はエナメル質の質と量に与える影響により大きく3つに分けることができるが、他のエナメル基質タンパクであるアメロブラスチンおよびエナメリンとともに、アメロゲニンはエナメル質形成不全症の一つである低成型エナメル質形成不全症を引き起こす原因遺伝子である³⁵⁾。lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) は、リソソーム膜のみならず細胞膜表面にも認められる内在性膜タンパクの一つである⁵⁴⁾⁻⁵⁶⁾。また Grp78 は Hsp70 ファミリーの一つであり、タンパクの折りたたみ、小胞体ストレスなどに関与する膜タンパクである⁵⁹⁾。これまでアメロゲニンに結合するタンパクとして LAMP-1⁵¹⁾、LAMP-3⁵⁰⁾、および Grp78⁵⁸⁾が報告されてきた。しかし、エナメル芽細胞の細胞分化過程におけるこれらのアメロゲニン結合タンパクの局在については不明な点が多く、またエナメル質形成不全症における、アメロゲニン結合タンパクの局在については報告がない。そこで、本研究はエナメル質形成不全症を呈するアメロゲニン点変異マウスにおけるアメロゲニン結合タンパクの局在とエナメル質形成について免疫組織学的に検討を行った。

5-1. Grp78 の局在について

これまでエナメル芽細胞における Grp78 の局在について Ravindran らが、マウス下顎切歯のエナメル芽細胞、白歯における前エナメル芽細胞の細胞質に発現があるとのみ報告しているが⁶⁷⁾、エナメル芽細胞分化過程における詳細な報告はない。今回、各分化段階のエナメル芽細胞における Grp78 の局在を蛍光免疫染色により検索を行った結果、野生型マウスにおいて、すべての細胞分化段階のエナメル芽細胞に Grp78 抗体に対する陽性反応が認められた。基質形成期では遠位細胞質の遠位部および近位部に、移行期では遠位細胞質の中央部に陽性反応が認められたことから、エナメル芽細胞の分化段階により Grp78 の局在が異なることが示された。また、点変異マウスでは、移行期および成熟期エナメル芽細胞の細胞質全体に Grp78 抗体に対する陽性反応が認められたことから、アメロゲニン遺伝子における点変異により Grp78 の局在が変化することが示唆された。一方、基質形成期エナメル芽細胞の遠位細胞質において、WGA 陽性反応が認められる領域の遠位部および近位部の領域に Grp78 の陽性反応が認められたが、野生型マウスおよび点変異マウスのいずれにおいても陽性反応の局在に違いは認められなかった。基質形成期エナメル芽細胞の遠位細胞質に WGA 陽性反応がみられ^{63), 64)}、電子顕微鏡による観察ではゴルジ体に WGA の局在が認められる⁶⁶⁾ことが報告されている。また Grp78 は、通常、主に小胞体に存在する⁶⁰⁾。さらに基質形成期エナメル芽細胞のゴルジ体は遠位細胞質において多数の小胞体に

とりかこまれるように存在することから⁶⁷⁾、アメロゲニン遺伝子点変異は基質形成期エナメル芽細胞における小胞体の局在に変化を及ぼさないことを示唆している。一方、Brookesらは本研究と同一のアメロゲニン遺伝子点変異マウスの基質形成期エナメル芽細胞についてマイクロダイセクション法および定量的 real-time PCR を用いて検討し、HSPA5 (BiP, Grp78)の遺伝子発現が野生型と比較して上昇していることを報告している⁶⁷⁾。本研究の Grp78 の蛍光免疫染色では、基質形成期エナメル芽細胞では野生型および点変異マウスの両方においてその分布に明らかな違いは認められなかった。しかし、移行期エナメル芽細胞において野生型マウスと比較して点変異マウスで細胞質全体に陽性反応が認められた。この差は Grp78 のタンパクと mRNA の発現の時期が異なる可能性がある。Grp78 は過剰な不良タンパクの蓄積による小胞体ストレスにおいて許容範囲内であれば不良タンパクの生成の抑制や分解を行い、許容範囲以上となればアポトーシスを引き起こす^{60,68-70)}。さらに、Grp78 は小胞体ストレスによって細胞質内に存在する Grp78 の発現を上昇させることが報告されている⁶⁰⁾。本研究においては、点変異マウスの移行期エナメル芽細胞で、アポトーシスのシグナル伝達経路で働く Caspase 3 およびその上流にみられる伝達因子である Caspase 9 の局在が認められた。この結果から、点変異マウスでは、Grp78 の発現上昇を引き起こし移行期エナメル芽細胞のアポトーシスを引き起こす可能性が示された。したがって、アメロゲニンのスプライシングアイソフォームの中で最も多く認められる M180 は TRAP を含むことから、アメロゲニン遺伝子における TRAP 領域の点変異が小胞体ストレスとなる可能性が考えられた。

5-2. LAMP-1 および LAMP-3 の局在について

本研究では、野生型マウス移行期および成熟期のエナメル芽細胞の遠位細胞質中央から遠位部に LAMP-1 の陽性反応が認められた。一方、点変異マウスにおいては細胞質全体に LAMP-1 の陽性反応が認められた。また、野生型マウス移行期エナメル芽細胞において、遠位細胞質の中央部に LAMP-3 の陽性反応が認められたが、点変異マウスでは細胞質全体に陽性反応が認められた。LAMP-1 および LAMP-3 は細胞膜表面に発現しアメロゲニンと結合することが報告されてきた^{50,51)}。また、内エナメル上皮細胞において細胞膜表面の LAMP-1 が LRAP と結合すること、LAMP-3 は M180 と結合し M180 の細胞内取り込みに関与することが報告されている⁵⁸⁾。本研究に使用したアメロゲニン遺伝子点変異マウスと同一マウスにおいて、Barronらは基質形成期エナメル芽細胞の細胞質にアメロゲニン抗体に対する強い陽性反応が認められたことを報告しているが、移行期エナメル芽細胞における反応については述べていない⁶¹⁾。本研究では、点変異マウスの基質形成期エナメル芽細胞の遠位細胞質にアメロゲニン抗体に対する陽性反応を認めるのみでなく、移行期エナメル芽細胞においても細胞質全体に強い陽性反応を認めることを新たに示した。これらの結果から、野生型マウスの移行期エナメル芽細胞では、アメロゲニンの細胞内局在がほとんどなく、アメロゲニンの合成が起こっていないと考えられる。一方、点変異マウス

の移行期エナメル芽細胞では、細胞内にアメロゲニン陽性反応が認められることから、ア
メロゲニン結合タンパクである Grp78、LAMP-1 および LAMP-3 を介して M180 および
LRAP が細胞内に取り込まれたか、点変異アメロゲニンの細胞内輸送や分泌が障害された
可能性が考えられる。以上の結果を総合すると、アメロゲニン点変異により分泌された
M180 または LRAP の細胞内取り込みが増大するか、点変異アメロゲニンの細胞内輸送が
障害されて、強い小胞体ストレスを生じ移行期エナメル芽細胞のアポトーシスが引き起こ
され、その結果として連続性をもって分化するエナメル芽細胞の配列が乱れてエナメル質
形成不全が起こると考えられる。

6. 謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究計画の立案、遺伝子変異マウスの飼育交配管理、および論文執筆にご指導を賜りました畠山雄次教授（福岡歯科大学学生体構造学分野機能構造学分野）、また試料作成および蛍光免疫染色の手技指導を賜りました松田裕子先生（福岡歯科大学成長発達歯学講座矯正歯科学分野）、データ収集を協力して頂きました竹崎公章先生（福岡歯科大学成長発達歯学講座矯正歯科学分野）、さらに、エナメル質形成不全症の臨床的知見および論文作成に多大なるご指導を賜りました石川博之前常務理事（学校法人福岡学園）、玉置幸雄教授（福岡歯科大学成長発達歯学講座矯正歯科学分野）に深く感謝致します。

最後に、福岡歯科大学成長発達歯学講座矯正歯科学分野の皆様にご心より感謝申し上げます。

7. 参考文献

1. 寺木良巳訳 (Avery JK 編) 口腔組織・発生学第2版 62-121, 2004.
2. 田畑純. エナメル質形成の細胞生物学 鹿児島大学歯学部紀要 22: 33-40, 2002.
3. Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent.* 2013: 684607, 2013.
4. Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-Ganss E, Miller M, Nguyen V, Nourkeyhani H, Gao Y, Wendel M, Ganss B. Amelotin-a Novel Secreted, Ameloblast-specific Protein. *J Dent Res.* 84: 1127-1132, 2005.
5. Park JC, Park JT, Son HH, Kim HJ, Jeong MJ, Lee CS, Dey R, Cho MI. The amyloid protein A Pin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. *Eur J Oral Sci.* 115: 153-160, 2007.
6. Salido EC, Yen PH, Koprivnikar K, Yu LC, Shapiro LJ. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *Am J Hum Genet.* 50: 303-316, 1992.
7. Lau EC, Mohandas TK, Shapiro LJ, Slavkin HC, Snead ML. Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. *Genomics.* 4: 162-168, 1989.
8. Zhou YL, Lei Y, and Snead ML. Functional antagonism between Msx2 and CCAAT/enhancer-binding protein alpha in regulating the mouse amelogenin gene expression is mediated by protein-protein interaction. *J Biol Chem.* 275: 29066-29075, 2000.
9. Zhou YL, Snead ML. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein alpha as a transactivator of the mouse amelogenin gene. *J Biol Chem.* 275: 12273-12280, 2000.
10. Xu Y, Zhou YL, Luo W, Zhu QS, Levy D, MacDougald OA, Snead ML. NF-Y and CCAAT/enhancer-binding protein alpha synergistically activate the mouse amelogenin gene. *J Biol Chem.* 281: 16090-16098, 2007.
11. Xu Y, Zhou YL, Gonzalez FJ, Snead ML. CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) maintains amelogenin expression in the absence of C/EBPalpha in vivo. *J Biol Chem.* 282: 29882-29889, 2000.
12. Lézot F, Thomas B, Greene SR, Hotton D, Yuan ZA, Castaneda B, Bolaños A, Depew M, Sharpe P, Gibson CW, Berdal A. Physiological implications of DLX homeoproteins in enamel formation. *J Cell Physiol.* 216: 688-697, 2008.
13. Venugopalan SR, Li X, Amen MA, Florez S, Gutierrez D, Cao H, Wang J, Amendt BA. Hierarchical interactions of homeodomain and forkhead transcription factors in regulating odontogenic gene expression. *J Biol Chem.* 286: 21372-21383, 2011.

14. Xu L, Matsumoto A, Sasaki A, Harada H, Taniguchi A. Identification of a suppressor element in the amelogenin promoter. *J Dent Res.* 89: 246-251, 2010.
15. Li X, Florez S, Wang J, Cao H, Amendt BA. Dact2 represses PITX2 transcriptional activation and cell proliferation through Wnt/beta-catenin signaling during odontogenesis. *PLoS One.* 8: e54868, 2013.
16. Lacruz RS, Smith CE, Bringas P Jr, Chen YB, Smith SM, Snead ML, Kurtz I, Hacia JG, Hubbard MJ, Paine ML. Identification of novel candidate genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling. *J Cell Physiol.* 227: 2264-2275, 2012.
17. Athanassiou-Papaefthymiou M, Kim D, Harbron L, Papagerakis S, Schnell S, Harada H, Papagerakis P. Molecular and circadian controls of ameloblasts. *Eur J Oral Sci.* 119: 35-40, 2011.
18. Mitsiadis TA, Tucker AS, De Bari C, Cobourne MT, Rice DP. A regulatory relationship between Tbx1 and FGF signaling during tooth morphogenesis and ameloblast lineage determination. *Dev Biol.* 320: 39-48, 2008.
19. Li W, Mathews C, Gao C, DenBesten PK. Identification of two additional exons at the 3' end of the amelogenin gene. *Arch Oral Biol.* 43: 497-504, 1998.
20. Bartlett JD, Ganss B, Goldberg M, Moradian-Oldak J, Paine ML, Snead ML, Wen X, White SN, Zhou YL. 3. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Curr Top Dev Biol.* 74: 57-115, 2006.
21. Gibson CW, Li Y, Suggs C, Kuehl MA, Pugach MK, Kulkarni AB, Wright JT. Rescue of the murine amelogenin null phenotype with two amelogenin transgenes. *Eur J Oral Sci.* 119: 70-74, 2011.
22. Gasse B and Sire J-Y. Comparative expression of the four enamel matrix protein genes, amelogenin, ameloblastin, enamelin and amelotin during amelogenesis in the lizard *Anolis carolinensis*. *Evo Devo.* 6: 29, 2015.
23. Bartlett JD, Ball RL, Kawai T, Tye CE, Tsuchiya M., Simmer JP. Origin, Splicing, and Expression of Rodent Amelogenin Exon 8. *J Dent Res.* 85: 894-899, 2006.
24. Yamakoshi Y, Richardson AS, Nunez SM, Yamakoshi F, Milkovich RN, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. Enamel proteins and proteases in *Mmp20* and *Klk4* null and double-null mice. *Eur J Oral Sci.* 119: 206-216, 2011.
25. Wyganowska-Świątkowska M, Urbaniak P, Nohawica MM, Kotwicka M, Jankun J. Enamel matrix proteins exhibit growth factor activity: A review of evidence at the cellular and molecular levels. *Exp Ther Med.* 9: 2025-2033, 2015.
26. Li W, Gao C, Yan Y, DenBesten P. X-linked amelogenesis imperfecta may result from decreased formation of tyrosine rich amelogenin peptide (TRAP). *Arch Oral Biol.* 48:

- 177-183, 2003.
27. Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent.* 2013: 684607, 2013.
 28. Smith CEL, Poulter JA, Antanaviciute A, Kirkham J, Brookes SJ, Inglehearn CF, Mighell AJ. Amelogenesis Imperfecta; Genes, Proteins, and Pathways. *Front Physiol.* 8: 435, 2017.
 29. Stephanopoulos G, Garefalaki ME, Lyroudia K. Genes and related proteins involved in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res.* 84: 1117-1126, 2005.
 30. Ravassipour DB, Hart PS, Hart TC, Ritter AV, Yamauchi M, Gibson C, Wright JT. Unique enamel phenotype associated with amelogenin gene (AMELX) codon 41 point mutation. *J Dent Res.* 79: 1476-1481, 2000.
 31. Hart PS, Aldred MJ, Crawford PJ, Wright NJ, Hart TC, Wright JT. Amelogenesis imperfecta phenotype-genotype correlations with two amelogenin gene mutations. *Arch Oral Biol.* 47: 261-265, 2002.
 32. Kim JW, Simmer JP, Hu YY, Lin BP, Boyd C, Wright JT, Yamada CJ, Rayes SK, Feigal RJ, Hu JC. Amelogenin p.M1T and p.W4S mutations underlying hypoplastic X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res.* 83: 378-383, 2004.
 33. Kida M, Sakiyama Y, Matsuda A, Takabayashi S, Ochi H, Sekiguchi H, Minamitake S, Ariga T. A novel missense mutation (p.P52R) in amelogenin gene causing X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res.* 86: 69-72, 2007.
 34. Gibson CW, Yuan ZA, Li Y, Daly B, Suggs C, Aragon MA, Alawi F, Kulkarni AB, Wright JT. Transgenic mice that express normal and mutated amelogenins. *J Dent Res.* 86: 331-335, 2007.
 35. Kawasaki K, Suzuki T, Weiss KM. Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 11356-11361, 2004.
 36. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Diekwisch TG, Lyaruu DM, Wright JT, Bringas P Jr, Slavkin HC. Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix. *J Struct Biol.* 115: 50-59, 1995.
 37. Haze A, Taylor AL, Blumenfeld A, Rosenfeld E, Leiser Y, Dafni L, Shay B, Gruenbaum-Cohen Y, Fermon E, Haegewald S, Bernimoulin JP, Deutsch D. Amelogenin expression in long bone and cartilage cells and in bone marrow progenitor cells. *Anat Rec (Hoboken).* 290: 455-460, 2007.
 38. Oida S, Nagano T, Yamakoshi Y, Ando H, Yamada M, Fukae M. Amelogenin gene expression in porcine odontoblasts. *J Dent Res.* 81: 103-108, 2002.
 39. Hatakeyama J, Sreenath T, Hatakeyama Y, Thyagarajan T, Shum L, Gibson CW, Wright JT, Kulkarni AB. The receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-

- mediated osteoclastogenic pathway is elevated in amelogenin-null mice. *J Biol Chem.* 278: 35743-35748, 2003.
40. Nuñez J, Sanz M, Hoz-Rodríguez L, Zeichner-David M, Arzate H. Human cementoblasts express enamel-associated molecules in vitro and in vivo. *J Periodontal Res.* 45: 809-814, 2010.
 41. Matsuzawa M, Sheu TJ, Lee YJ, Chen M, Li TF, Huang CT, Holz JD, Puzas JE. Putative signaling action of amelogenin utilizes the Wnt/beta-catenin pathway. *J Periodontal Res.* 44: 289-296, 2009.
 42. Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, Snead ML, Somerman MJ. Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol.* 74: 1423-1431, 2003.
 43. Kunitatsu R, Tanimoto K, Tanne Y, Kamiya T, Ohkuma S, Huang YC, Yoshimi Y, Miyauchi M, Takata T, Tanne K. Amelogenin enhances the proliferation of cementoblast lineage cells. *J Periodontol.* 82: 1632-1638, 2011.
 44. Warotayanont R, Zhu D, Snead ML, Zhou Y. Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis in mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 367: 1-6, 2008.
 45. Mitani K, Haruyama N, Hatakeyama J, Igarashi K. Amelogenin splice isoforms stimulate chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Oral Dis.* 19: 169-179, 2012.
 46. Amin HD, Ethier CR. Differential effects of tyrosine-rich amelogenin peptide on chondrogenic and osteogenic differentiation of adult chondrocytes. *Cell Tissue Res.* 364: 219-224, 2016.
 47. Hakki SS, Bozkurt SB, Türkay E, Dard M, Purali N, Götz W. Recombinant amelogenin regulates the bioactivity of mouse cementoblasts in vitro. *Int J Oral Sci.* 10: 15, 2018.
 48. Kunitatsu R, Awada T, Yoshimi Y, Ando K, Hirose N, Tanne Y, Sumi K, Tanimoto K. The C-terminus of the amelogenin peptide influences the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol.* 89: 496-505, 2018.
 49. 讚井彰一、西村英紀. 組織再生を目的としたアメリロジェニン研究の現在. *日歯周誌.* 61: 136-141, 2019.
 50. Wang HJ, Tannukit S, Zhu DH, Snead ML, Paine ML. Enamel matrix protein interactions. *J Bone Miner Res.* 20: 1032-1040, 2005.
 51. Tompkins K, George A, Veis A. Characterization of a mouse amelogenin [A-4]/M59 cell surface receptor. *Bone.* 38: 172-180, 2006.
 52. Le TQ, Zhang Y, Li W, Denbesten PK. The effect of LRAP on enamel organ epithelial cell differentiation. *J Dent Res.* 86: 1095-1099, 2007.
 53. Zhang H, Tompkins K, Garrigues J, Snead ML, Gibson CW, Somerman MJ. Full length

- amelogenin binds to cell surface LAMP-1 on tooth root/periodontium associated cells. *Arch Oral Biol.* 55: 417-425, 2010.
54. Cook NR, Row PE, Davidson HW. Lysosome associated membrane protein 1 (Lamp1) traffics directly from the TGN to early endosomes. *Traffic.* 5: 685-699, 2004.
 55. Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10: 623-635, 2009.
 56. Duffield A, Kamsteeg EJ, Brown AN, Pagel P, Caplan MJ. The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci USA.* 26: 15560-15565, 2003.
 57. Le TQ, Zhang Y, Li W, Denbesten PK. The effect of LRAP on enamel organ epithelial cell differentiation. *J Dent Res.* 86 : 1095-1099, 2007.
 58. Fukuda T, Sanui T, Toyoda K, Tanaka U, Taketomi T, Uchiumi T, Nishimura F. Identification of novel amelogenin-binding proteins by proteomics analysis. *PLoS One.* 8: e78129, 2013.
 59. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci.* 226: 156-163, 2019.
 60. Zhu G, Lee AS. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis. *J Cell Physiol.* 230: 1413-1420, 2015.
 61. Barron MJ, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Hunt C, Mironov A, Kingswell NJ, Maycock J, Shuttleworth CA, Dixon MJ. A mutation in the mouse *Amelx* tri-tyrosyl domain results in impaired secretion of amelogenin and phenocopies human X-linked amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet.* 19: 1230-1247, 2010.
 62. Masuya H, Shimizu K, Sezutsu H, Sakuraba Y, Nagano J, Shimizu A, Fujimoto N, Kawai A, Miura I, Kaneda H, Kobayashi K, Ishijima J, Maeda T, Gondo Y, Noda T, Wakana S, Shiroishi T. Enamelin (Enam) is essential for amelogenesis: ENU-induced mouse mutants as models for different clinical subtypes of human amelogenesis imperfecta (AI). *Hum Mol Genet.* 14: 575-583, 2005.
 63. Akita H, Kobayashi Y, Kagayama M. A histochemical study on lectin binding in the immature enamel and secretory ameloblasts of rat incisors. *Tohoku J Exp Med.* 155: 139-149, 1988.
 64. Kagayama M, Zhu JX, Sasano Y, Sato H, Mayanagi H. Development of interglobular dentine in rat molars and its relation to maturation of enamel. *Anat Embryol (Berl).* 196: 477-483, 1997.
 65. Chazotte B. Labeling membrane glycoproteins or glycolipids with fluorescent wheat germ agglutinin. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011: pdb.prot5623, 2011.
 66. Nanci A, Ahluwalia JP, Zalzal S, Smith CE. Nanci A. Cytochemical and biochemical

- characterization of glycoproteins in forming and maturing enamel of the rat incisor. *J Histochem Cytochem.* 37: 1619-1633, 1989.
67. Ravindran S, Gao Q, Ramachandran A, Sundivakkam P, Tiruppathi C, George A. Expression and distribution of grp-78/bip in mineralizing tissues and mesenchymal cells. *Hist Cell Biol.* 138: 113-125, 2012.
 68. Brookes SJ, Barron MJ, Boot-Handford R, Kirkham J, Dixon MJ. Endoplasmic reticulum stress in amelogenesis imperfecta and phenotypic rescue using 4-phenylbutyrate. *Hum Mol Genet.* 23: 2468-2480, 2014.
 69. Xiong Z, Jiang R, Li X, Liu Y, Guo F. Different Roles of GRP78 on Cell Proliferation and Apoptosis in Cartilage Development. *Int J Mol Sci.* 16: 21153-21176, 2015.
 70. Xu L, Harada H, Taniguchi A. The effects of LAMP1 and LAMP3 on M180 amelogenin uptake, localization and amelogenin mRNA induction by amelogenin protein. *J Biochem.* 144: 531-537, 2008.