総 説

歯周組織の弾性系線維

矢 嶋 俊 彦 敦 賀 英 知 入 江 一 元

北海道医療大学歯学部口腔解剖学第一講座

Elastic System Fibers in the Periodontal Tissues

Toshihiko Yajima, Eichi Tsuruga and Kazuharu Irie

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

緒 言

歯周組織は歯の支持組織で、セメント質、歯根膜、歯槽骨と歯肉の一部によって構成されている。特に、歯根膜（歯周靱帯）と歯肉固有層は高度に特殊化した線維性結合組織であり、歯の固定・支持と共に咀嚼力・咬合圧の緩衝作用も果たしている。これらの組織の主たる線維成分はコラーゲン線維であるが、それと共に弾性系線維（elastic system fibers）の存在が明らかにされている。弾性系線維の一つであるオキシタラン線維（oxytalan fibers）は Fullmer と Lillei (1958)¹⁾ によって、過酸化処理後に弾性線維染色される線維成分として、歯根膜で初めて報告された。

その後、歯周組織における弾性系線維は部位特異的局在性を示すことが明らかにされてきた。すなわち、歯肉固有層ではエラスチン沈着を伴う全ての弾性系線維が存在するのに対し、歯根膜ではエラスチン沈着を伴わないオキシタラン線維のみが存在することが細胞生物学的に報告されていた。われわれは同一歯に由来するヒト歯肉線維芽細胞と歯根膜線維芽細胞を用いて、歯根膜線維芽細胞はトロポエラスチンを発現していないことを分子生物学的に初めて明らかにした²⁻⁵⁾。また、これまで困難とされてきたトロポエラスチンと微細線維を培養細胞層から抽出する方法を確

立し、定量分析を可能にした³⁾。

歯周組織における弾性系線維はその機能とともに病態・疾患等も十分に解明されていない。しかし、歯周組織は弾性系線維の細胞生物学・分子生物学的研究の最適材料であり注目されてきている。そこで、弾性系線維の構成成分と歯周組織の弾性系線維について概説してみたい。

弾性系線維

弾性系線維は系統発生的にも、固体発生的にもコラーゲン線維より遅れて出現する。コラーゲン線維は原生動物を除く動物に存在するが、弾性線維（エラスチン）は硬骨魚類の血管壁で初めて出現し、無脊椎動物の組織にエラスチンは存在しない。

弾性系線維は形態学的観察からエラスチンと微細線維からなり、その染色性も異なることが知られている⁶⁾。さらに、弾性系線維はエラスチンと微細線維の構成比率より、エラスチンを全く含まない微細線維のみから構成されるオキシタラン線維、少量のエラスチンの周囲と内部に多数の微細線維が存在するエラウニン線維（elaunin fibers）と、多量のエラスチンと少数の微細線維を持つ弾性線維（elastic fibers）の3タイプに分類されている⁷⁾（図1, 2）。

エラスチンは弾性線維の主要成分であり、大動脈で

連絡先：矢嶋 俊彦

〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757 北海道医療大学歯学部口腔解剖学第一講座

Toshihiko Yajima

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

1757 Kanazawa, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

E-mail tyajima@hoku-iryo-u.ac.jp

図1 弾性系線維の模式図

弾性系線維はエラスチンと微細線維の構成比率より3種類に分類される。微細線維のみから構成されているオキシタラン線維、エラスチンの周囲と内部に多数の微細線維が存在するエラウニン線維と、多量のエラスチンと少数の微細線維からなる弾性線維に分けられる。

は乾燥重量の約50%、中小動脈では約20%を占める。しかし、皮膚や歯肉のエラスチンは2-4%にすぎない。

エラスチン沈着を伴う弾性系線維は通常のヘマトキシリン・エオジン染色、メチレン・ブルー染色やトリジン・ブルー染色では染色されない。そのため、Weigertのレゾルシン・フクシン染色、Verhoeffのオルセイン・鉄ヘマトキシリン染色やGomoriのアルデヒド・フクシン染色などの弾性線維染色を必要とする。これらの染色により、エラスチン沈着した弾性系線維は直径10 μ m以下の線維として観察される。エラスチン、オキシタラン線維に対する抗体を利用した免疫組織化学的染色は、染色特異性が非常に高く、弾性系線維の詳細な観察と解析には有用な方法である。また、組織をギ酸などで長時間処理すると弾性線維のみが溶解せずに残り、走査型電子顕微鏡での立体観察に利用できる。

図2 弾性系線維の電子顕微鏡像

a: 歯根膜のオキシタラン線維 (Ox)。オキシタラン線維は微細線維 (矢頭) から構成されている。Co: コラーゲン細線維。×48,000。b: 歯肉固有層のエラウニン線維 (Eu)。エラスチン (*) 周囲に多数の微細線維が観察される。矢頭は管状構造を示す微細線維の横断像。×48,000。c: 歯肉固有層の弾性線維 (Es)。エラスチン周囲に少数の微細線維が観察される。Co: コラーゲン細線維の横断像; Fb: 線維芽細胞。×24,000。

弾性系線維の構成成分

弾性系線維の構成成分と線維形成の機構については

多数の研究がなされているが、十分には解明されていない。その主なものを以下に述べる。

1. エラスチン

エラスチンは通常透過型電子顕微鏡染色である酢酸ウランと鉛の二重染色ではほとんど染色されない無構造部分として観察されが、タンニン酸染色により濃染する。

不溶性エラスチンのアミノ酸組成では、グリシンが30%を占め、プロリン、アラニンに富む。しかし、ヒドロキシプロリンが少なく、ヒドロキシリジンを含まない。不溶性エラスチンは、多くの架橋結合を含んでおり、デスモシンやイソデスモシンは4つのリシン側鎖からなり、エラスチンに特徴的なものである。エラスチンはトロポエラスチン (tropoelastin) の70 kDa 分子として合成され、分泌後リシルオキシダーゼにより架橋され、会合して不溶性のエラスチンとして沈着する。

トロポエラスチンのアミノ酸組成では、デスモシン、イソデスモシンなどの架橋アミノ酸を含んでいない点でエラスチンと異なる他は同じである。ヒト・トロポエラスチンは786個のアミノ酸残基からなるが、かなり高頻度に選択的スプライシングが起こるため、少しずつ大きさの異なるトロポエラスチンが発現される。従って、トロポエラスチンは65–70 kDaとなる。トロポエラスチン分子中には、バリン、グリシン、プロリンに富む疎水性ドメインとアラニンに富み、2–3個のリシン残基を持つ架橋ドメインが交互に14–16回反復して出現する。これらが伸び縮み可能で弾性を持つ β -ラセン構造の形成に不可欠であることが明らかにされている。

2. 微細線維

微細線維 (elastin-associated microfibrils) は弾性系線維に存在する直径10–12 nmの管状線維構造である。微細線維は枝分かれしない長い線維で、通常電子染色で染色され、観察できる。抽出微細線維のロータリー・シャドーイング像などでは、微細線維は10–12 nmの線維部分と56 nm周期で存在するビーズ状構造 (直径<22 nm) で構成 (bead on a string) されている。この微細線維はエラスチン沈着した弾性系線維ばかりでなく、エラスチン沈着の認められない結合組織にオキシタラン線維として広く存在する。

1) フィブリリン

微細線維の主構成成分はフィブリリン (fibrillin) と呼ばれる350 kDaの糖タンパク質である⁸⁾。フィブリリンからなる微細線維はクラゲなどの無脊椎動物から脊椎動物まで広く存在する。

フィブリリンにはフィブリリン-1とフィブリリ

ン-2が存在する。フィブリリン-1はシステインに富み、特徴的モチーフが繰り返す構造を示す。その一つは47個のEGF様モチーフであり、その内の43個はカルシウム結合配列を有する (カルシウム結合性EGF様ドメイン)。さらにTGF β 結合タンパク様ドメインが存在し、その1カ所にRGDモチーフを持つ。RGDモチーフは微細線維と細胞表面のインテグリンとの結合に関与していると考えられている。フィブリリン-1とフィブリリン-2の構造は非常に類似した糖タンパク質であり、両者間のアミノ酸の約80%は相同である⁹⁾。フィブリリン-1とフィブリリン-2の相違点の一つは、フィブリリン-1がN末端にプロリンに富む部位を持つのに対して、フィブリリン-2はグリシンに富む部位に変化していることである。また、フィブリリン-2ではRGDモチーフが2カ所存在する。フィブリリン-2は一般的にフィブリリン-1より発生の早期に発現し、弾性系線維形成に関連性が強いと考えられている¹⁰⁾。フィブリリンがサイド・サイド結合によって会合するとき、カルシウム架橋がカルシウム結合性EGF様ドメイン間に生じる。これらカルシウムがさらに微細線維に形態的硬さを付与し、安定化に働いていると考えられている。そのため、カルシウムをキレートすると、微細線維形成が障害され、不規則な周期構造の微細線維が出現する。さらに、分子間のS-S結合が微細線維の形成と安定化に大切な役割を果たしているため、S-S結合の還元剤処理により、微細線維 (フィブリリン) を可溶化できる。また最近、フィブリリン-1はトロポエラスチンと直接結合することも報告されている¹¹⁾。

フィブリリン分子はN末端からC末端までの長さが160 nmである。しかし、分子は折りたたまれて存在し、この折りたたみ部位がビーズ状構造部に相当し、ビーズ状構造の周期は56–100 nmである。フィブリリンからなる微細線維はビーズ状構造間の周期56–100 nmでは可逆的に伸張・収縮できる。さらに引き延ばされると160 nm近くまで周期が変化するが、この状態に達すると線維は変形し、元の状態には戻らない¹²⁾。上記の周期構造変化は微細線維の弾性変化を示唆するものと考えられている¹³⁾。また、この折りたたみ部分 (蝶番) は、TGF β 結合タンパク様ドメインとカルシウム結合性EGF様ドメイン間にあり、ビーズ状構造に観察される部位と考えられている。1本の微細線維は6–8本のフィブリリン分子からなることが観察されているが、他のタンパク分子が線維形成にどのように関与しているかについては不明である。しかし、フィブリ1分子に1ビーズ状構造が存在し、フィブリリン-1のN末端とC末端が隣接す

る所見, フィブリリン分子径は2.2 nmで, 微細線維径は10-12 nmであるなどから, 分子のN末端とC末端が結合し(head to tail), さらにそれらが平行に会合して線維形成されると推測されている。

2) LTBP

LTBP (潜在型TGF β 結合タンパク質, latent transforming growth factor β -binding protein)は, 増殖・分化, 細胞の付着・移動の重要な因子であるTGF- β の結合調節因子として抽出された。LTBPはフィブリリンのスーパー・ファミリーであり, フィブリリンとの相同性が高く, カルシウム結合性EGF様ドメインを持つ。また, TGF- β と特異的に結合するTGF β 結合タンパク様ドメインが存在する。LTBPファミリーはLTBP-1からLTBP-4 (120-210 kDa)が存在する。LTBP-1とLTBP-2はエラスチン沈着する微細線維にのみ存在し, LTBP-2は微細線維に強く結合している¹⁴⁾。LTBP-2はトロポエラスチンと共存することも報告されている。LTBP-2, LTBP-3をノックアウトしたマウスでは, 明らかな弾性線維障害は認められておらず, エラスチン沈着機構における役割は十分に明らかにされていない。LTBPはTGF- β の分泌と細胞外基質での結合に関係しているので, 弾性系線維形成ばかりでなく, 発生, 形態形成を制御している重要な糖タンパク質である。

3) MAGP

フィブリリンの他に, 微細線維の重要成分として, MAGP (微細線維結合性糖タンパク質, microfibril-associated glycoprotein)が抽出されている¹⁵⁾。ヒトMAGP-1は183残基からなる31 kDa分子で, 微細線維のビーズ状構造(折りたたみ部分)に局在している¹⁶⁾。MAGP-1は微細線維とジスルフィド結合し, 折りたたみを起こし弾性付与していると考えられている。すでに述べたように, ビーズ状構造は周期的に配列し, この周期は微細線維の伸長状態により変化することが明らかにされている。また, MAGP-1のN末端領域はトロポエラスチンとVI型コラーゲンに結合する。MAGP-2 (25 kDa)は170-173残基がMAGP-1と同じで, 微細線維とジスルフィド結合し, エラスチン沈着, エラスチン非沈着両微細線維に存在している¹⁷⁾。MAGP-2はフィブリリン-1とフィブリリン-2に結合し, MAGP-1と同様に微細線維のビーズ状構造部と, ビーズ状構造よりのビーズ間(肩)の2カ所に局在する。これらから, MAGPは微細線維のコイル状構造形成における架橋結合形成, 安定性に働いている可能性が示唆されている。MAGP-2はN末端領域にRGD配列を持ち, 細胞のインテグリンと

結合もできる。また, MAGP-2はフィブリリン-1とフィブリリン-2の会合に関与していることが明らかにされている。

4) MFAP

微細線維にはMFAP (微細線維結合性タンパク質, microfibril-associated protein)の存在も報告されている。MFAP-1は54 kDaタンパク質で¹⁸⁾, 他の微細線維関連タンパクとの相同配列を持たない。しかし興味あることに, MFAP-1の遺伝子(15q15-21)は第15染色体のフィブリリン-1遺伝子(15q21.1)と同一部位に存在する。MFAP-2はMAGP-1と同一タンパク質である。MFAP-3はMFAP-1と同様に他の微細線維関連タンパク質との相同配列を持たない。MFAP-3遺伝子(5q32-33.2)は第5染色体のフィブリリン-2遺伝子(5q23-31)の近傍に存在している。MFAP-4 (36 kDa)はフィブリノーゲン様ドメインとRGDモチーフを持っている。

5) エミリン

エミリン(elastin microfibril interface located protein, emilin)はエラスチンと微細線維の界面に存在する115 kDaの糖タンパク質である¹⁹⁾。エミリンは現在, エミリン-1からエミリン-5が報告されているが, エミリン-1以外の分子のトロポエラスチン沈着機能への関与は不明である。エミリン-1遺伝子欠損マウスでは, 大動脈や皮膚の弾性線維の変質が認められている。エミリン-1はエラスチンとフィブリン-5に結合, エラスチン沈着を調節していると考えられている²⁰⁾。最近, エミリン-5は骨芽細胞と軟骨膜細胞での発現が報告されている²¹⁾。

6) フィビュリン

フィビュリン(fibulin)もまたエラスチンと微細線維間に存在することが知られている。フィブリリンとLTBPのスーパー・ファミリーで, 5種類が知られている。フィビュリンもN末端にカルシウム結合性EGF様ドメインを有する。フィビュリン-1はさらに5つの異性体(A-D, 65.5-77.3 kDa)が知られており, エラスチンに存在し, 微細線維には存在しない。フィビュリン-1はフィブリリンやトロポエラスチンとも相互作用する。フィビュリン-2は175 kDaで, 微細線維とエラスチンとの界面での存在が報告されており, エラスチン沈着機構で作用していると考えられている²²⁾。

フィビュリン-5(ダンス, DANCE, 66 kDa)も微細線維とエラスチン界面での局在が報告されている^{23,24)}。フィビュリン-5遺伝子欠損マウスでは体内中の弾性線維が断裂し, 曲がりくねった大動脈, 重篤な肺気腫, 皮膚弛緩症を示す。フィビュリン-5はエラ

スチンと微細線維を直接結合するばかりでない。フィブリリン-5はカルシウム結合性EGF様ドメインにインテグリンと結合するRGDモチーフを持つ。そのため、細胞表面のインテグリンのリガンドとしても作用し、細胞と弾性線維の結合にも関連し、弾性線維形成の安定化にも関与している可能性が示唆されている。また、フィブリリン-5はリシルオキシダーゼと相互作用することも報告されている²⁵⁾。フィブリリン-3とフィブリリン-4は、フィブリリン-5のファミリー分子であるが、RGDモチーフもなく、その機能も解明されていない。

7) リシルオキシダーゼ

可溶性のトロポエラスチンはリシルオキシダーゼ(LOX)の作用で架橋結合が形成され不溶性エラスチンとして沈着する。リシルオキシダーゼは特定のリシン残基に酸化的脱アミノ反応して、アリシンを形成する。産生されたアリシン間でのアルドール縮合、あるいは他のリシン残基とのシッフ塩基形成を介して、エラスチン分子間にデスモシンとイソデスモシンの架橋結合が生じる。これらの架橋は4つのリシン側鎖からなり、エラスチンに特徴的なものである。そのため、リシルオキシダーゼ欠損マウスでは、弾性線維形成がみられない²⁵⁾。また、リシルオキシダーゼの活性には銅イオンを必要とする。リシルオキシダーゼの阻害剤(β -aminopropionitrile)を添加すると、微細線維は疎に配列し、エラスチン沈着が阻害され、正常な成熟弾性線維形成はみられない。

リシルオキシダーゼ遺伝子(5q23.3-31.2)は第5染色体のフィブリリン-2遺伝子(5q23-31)と同一領域に存在する。また、シシルオキシダーゼ様タンパク質(lysyl oxidase-like protein)としてLOXL1からLOXL3が知られている。これらの酵素作用をするC末端は同一であるが、N末端は異なる機能を持っている。LOXL2遺伝子(15q22)は第15染色体のフィブリリン-1(15q21.1)、MFAP1遺伝子(15q15-21)近傍に存在する。

オキシタラン線維

オキシタラン線維は微細線維の集合体で、直径約0.1–1.5 μm で、エラスチン沈着は見られない(図2a)。歯根膜にはオキシタラン線維のみが存在し、エラスチン沈着した弾性系線維は存在しない(図3)。歯根膜のほか、血管外膜、神経上膜、神経周膜、腱、鼓膜、毛様体、真皮等の結合組織で観察され、現在ではほとんど全ての結合組織にその存在が確認されている線維である。歯周組織におけるオキシタラン線維と

エラウニン線維の分布とその微細構造については多数の研究が報告されている。

歯根膜のオキシタラン線維は、歯根を歯軸方向に三次元的に囲み、しばしば血管やリンパ管の複合体に終わるか、近接していることが観察されている。そのため、オキシタラン線維は主線維と直交あるいは交叉するように走行していることが多い。また、神経線維束周囲にも存在している。オキシタラン線維の一端がセメント質に埋入されていることはあるが、歯槽骨に埋入されている報告はない。

歯根膜のオキシタラン線維の機能としては、脈管周囲や圧力のかかる部分に分布していることから、脈管の機械的支持²⁶⁾と血流調節作用²⁷⁾が考えられていた。また、オキシタラン線維は歯の萌出方向をガイドしているとの報告もある。微細線維自身はすでに述べたように伸張性つまり弾性的性質を持っている¹³⁾。このため、エラスチンには及ばないが、局在する組織に適した弾性作用をしていることが推測される。従って、多くのオキシタラン線維は組織構造の支持作用とともに、組織の弾性・膨張調節作用をしているのではないかと考えられている。埋伏歯では歯根膜のオキシタラン線維は発達しておらず、機能圧の増加に伴いオキシタラン線維束の径や量が増すことも報告されている²⁶⁾。しかし、歯根膜のオキシタラン線維の機能は、まだ十分には明らかにされていない。また、その改造・代謝についても明らかにされていない。

歯肉、歯根膜と骨膜の3部位で、生後3週でオキシタラン線維は観察され、その後歯肉・骨膜ではエラウニン線と弾性線維が出現する。これに対して、エラスチン沈着を伴うエラウニン線維と成熟弾性線維形成は歯根膜では見られない(図3)²⁸⁾。これは微細線維の性状に部位特異性があることを示していると考えられる。最近、微細線維を構成するフィブリリンに組織特異性があることが示唆されてきおり⁹⁾、歯根膜の微細線維と歯肉・骨膜の微細線維では異なる可能性が示されている。弾性系線維を分類し、その組織特異性を考える上で、微細線維の性状と構造の解明は今後の重要な課題である。

エラウニン線維

エラウニン線維は光学顕微鏡的にはオキシタラン線維と同じ染色性を示す。しかし、微細構造学的には多数の微細線維の間に少量のエラスチンが存在している(図2b)。エラウニン線維はエラスチン沈着している点で、オキシタラン線維と明確に区別される。逆に、弾性線維との明確な区分は存在しない。

図3 歯肉線維芽細胞と歯根膜線維芽細胞における弾性系線維形成の差異
歯肉線維芽細胞では全ての弾性系線維形成がみられる。歯根膜線維芽細胞ではオキシタラン線維形成のみで、エラスチン分泌はみられない。

エラウニン線維は歯肉の他、血管の弾性板、弾性軟骨、腱、真皮に認められている。生体組織ではオキシタラン線維と弾性線維をつなぐ線維叢のように観察されることが多い。そのため、オキシタラン線維から成熟弾性線維への移行形とも考えられている。また、ヒト皮膚では、オキシタラン線維、エラウニン線維ならびに弾性線維は互いに密接な構造的関係を保っているため、これらの線維は発生的・機能的に一つの系、つまり弾性系線維を構成していると考えられるようになった^{7,29)}。歯肉固有層にはエラスチン沈着を伴うエラウニン線維と弾性線維が存在する(図3)。

弾性線維

弾性線維は多量のエラスチンと少数の微細線維を持つ線維で(図2c)、生の状態では黄色みを帯びて見えるので、黄色線維とも呼ばれる。光学顕微鏡標本では、コラーゲン線維とは異なって枝分かれした構造をとり、立体的には網状構造をなしている。歯肉固有層と骨膜で観察される。弾性線維が発達した動脈系では、弾性膜ないし弾性板を形成している

エラスチン沈着機構(弾性線維形成過程)

歯周組織、皮膚では微細線維とトロポエラスチン産生細胞は線維芽細胞である。コラーゲンと同様に、フィブリリンとトロポエラスチンが粗面小胞体で形成

され、ゴルジ装置、分泌顆粒を経て細胞外に分泌される。また、動脈の中膜では、平滑筋細胞が微細線維・エラスチン産生細胞である。

エラスチン沈着は秩序だった多数の過程を経て行われる³⁰⁾。エラスチン沈着においては、まず微細線維が形成される。微細線維が平行に配列した線維束を形成し、微細線維を足場(骨格)としてその周囲にエラスチン沈着が開始する³¹⁾。歯肉では最初に微細線維が出現し、それらが集合してオキシタラン線維を形成する。オキシタラン線維を構成する微細線維周囲と線維間隙にエラスチンが沈着し、エラウニン線維の形成が開始される。エラスチン沈着の増加に伴い、多くの微細線維は線維束の外側に移動する。エラスチン沈着量に対して、微細線維量は相対的に減少する。しかし、微細線維は消失するのではなく弾性線維の外側に主に存在するが、エラスチン内部にも微細線維が埋め込まれている。そのため、エラスチンは常に微細線維と共存し、エラスチン単独で沈着することはない。これに対し、微細線維はエラスチンとは独立して、会合・形成される。このエラスチン沈着過程では、エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンが足場である微細線維(フィブリリンが主構成成分)と分子間相互作用し、さらにトロポエラスチン分子間に特有な架橋がリジロキシダーゼによって形成され、不溶性のエラスチンになる必要がある。エラスチン沈着機構は、エラスチンと微細線維の電荷、あるいはエラスチン・リセプターの関与が示唆されていた。さらにフィブリリ

ン, MAGP, LTBP, MFAP, フィビュリン, エミリンなどの微細線維関連分子が重要な働きをしていることが明らかにされてきているが, その個々の機能は十分には解明されていない。

われわれは培養実験系で, トロポエラスチンとフィブリリン-2 遺伝子発現および細胞層への沈着量に相関関係があることを明らかにした²⁻⁴⁾。これまで, 免疫組織化学的所見からフィブリリン-2 がトロポエラスチンの沈着に関与している可能性が示唆されてきたが, 分子生物学的に証明した。歯肉線維芽細胞では, フィブリリン-1, フィブリリン-2, トロポエラスチンの遺伝子発現が認められた。しかし, 歯根膜線維芽細胞では, フィブリリン-1, フィブリリン-2 の遺伝子発現は認められたが, トロポエラスチンの遺伝子発現は認められなかった。また, フィブリリン-1 の発現量は, 歯肉線維芽細胞で経時的に著しい増加を示したが, 歯根膜線維芽細胞ではわずかな発現量しか認められなかった。培養 4 週において, 歯肉線維芽細胞は歯根膜線維芽細胞の約 14 倍のフィブリリン-1 を, また, 約 10 倍のフィブリリン-2 を発現していた。エラスチン沈着ではフィブリリン-2 がその誘導的機能を果たす可能性が示唆されており⁹⁾, フィブリリン-2 の発現増加とエラスチン沈着の相関が示唆された。また, フィブリリン-1 とフィブリリン-2 とともにトロポエラスチン結合部位を N 末端側にグリシンに富むドメインに持っていることから, 微細線維として会合した立体構造の差異がトロポエラスチン沈着に反映している可能性がある。

歯肉線維芽細胞の培養系で, トロポエラスチン遺伝子発現のピークに遅れてフィビュリン-5 のピークがみられた。また, トロポエラスチン遺伝子を RNA 干渉法 (siRNA) でノックダウンすると, フィビュリン-5 遺伝子発現も抑制されることを明らかにした⁵⁾。この結果はトロポエラスチン遺伝子発現あるいはタンパク質自身が, 直接的または間接的にフィビュリン-5 遺伝子発現に関与していることを示唆している。

歯肉線維芽細胞の培養系で, MAGP-1 とフィブリリン-2 の遺伝子を RNA 干渉法 (siRNA) でノックダウンすると, トロポエラスチンの沈着が対照群の 30% 以下に抑制された。免疫組織化学的にも同様な抑制が観察された。これらから, 少なくとも MAGP-1 とフィブリリン-2 はトロポエラスチン沈着を直接あるいは間接的に制御していることを明らかにしてきている³²⁾。

さらに, 微細線維への沈着機構への役割とともに, 弾性系線維形成における微細線維の機能としては, エラスチン沈着の場の維持と, 弾性線維の形態と方向の

決定が考えられている。また, MAGP-1 あるいはフィブリリン-1 遺伝子をノックアウトしたマウスが生存することも報告されている³³⁾。組織によって弾性系線維の微細線維の組成に変化があることも報告されており, エラスチン沈着機構の解明にはさらなる研究が必要である。

弾性系線維の消化・分解

弾性系線維の消化・分解とその改造現象もほとんど明らかにされていない。エラスチンに対する特異的消化分解酵素の一つはセリンプロテアーゼである。セリンプロテアーゼにはエラスターゼ, キモトリプシン, トリプシンなどが含まれる。エラスターゼは好中球のアズール顆粒 (ライソゾーム) に含まれている。炎症において好中球は細菌などの障害因子を貪食し, 細胞内消化すると共に, エラスターゼを含むライソゾーム酵素を分泌する。実験的にラットに歯肉炎を惹起すると, 成熟弾性線維が半減し³⁴⁾, また, 歯周炎の歯肉溝滲出液にエラスターゼ活性が認められている。

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-2, MMP-9, MMP-12) はエラスチン消化能を持っている。MMP-2 はコラーゲン, フィブロネクチン, プロテオグリカンを消化すると共に, エラスチン, フィブリリンも消化することが明らかにされている³⁵⁾。組織中には TIMP と呼ばれる MMP 阻害物質があり, MMP の活性を制御している。生体では, プロエンザイムあるいはプロエンザイム TIMP 複合体は膜貫通ドメインをもつ MT-MMP により細胞表面上で活性化される。われわれは, 歯根膜線維芽細胞培養系ではプロ MMP-2 の存在が認められ, TIMP-2 添加でフィブリリン-2 蓄積量が増加する興味ある結果を得ている³⁶⁾。

MMP-9 はゼラチン, プロテオグリカン, IV, V, VII, X 型コラーゲンを消化するとともに, エラスチンを消化する。プロエンザイムとして分泌され, カテプシン G, MMP-3, プラスミンの作用を受けて活性型となる。同様にエラスチン活性をもつ MMP-12 については, 現在までにほとんど研究されていない。MMP-12 はマクロファージ・メタロエラスターゼとも呼ばれ, 炎症性マクロファージにより分泌されるエラスチン分解性酵素として精製されている。MMP-12 は I 型コラーゲンに対しては全く活性がないが, エラスチン分解活性の他にファイブロネクチン, ラミニン, ビトロネクチン, IV 型コラーゲン, ヘパリン硫酸などに対する分解活性を示す。このことから, MMP-12 は炎症時に基底膜を破壊し, 炎症巣

へのマクロファージや白血球の遊走を容易にすると考えられている。

フィブリリン分子と微細線維はセリンプロテアーゼによっても消化される。また、MMP-2, -3, -9, -12, -13 で消化される³⁵⁾。

弾性系線維と遺伝子疾患

トロポエラスチン遺伝子は第7染色体 (7q11.2) にあり、その突然変異では、大動脈弁上部狭窄症 (SVAS) などの血管奇形が起こる³⁷⁾。大動脈弁上部狭窄症は全身の閉塞性病変を伴う疾患であるが、上行大動脈に最も重篤に起こり、心不全を引き起こす。

ウィリアムズ症候群は第7染色体の微小欠損を起因とする多臓器の発達障害を示し、大動脈弁上部狭窄症のトロポエラスチン遺伝子の片側欠失と関連している。そのため、エラスチン沈着の減少、弾性線維の微小構造の変異が報告されている³⁸⁾。本症候群の顎顔面領域の特徴として、広い前額、太い眉、丸く垂れた頬、幅広で低い鼻根部、眼間狭小、矮小歯あるいは先天的欠如、エナメル質の低形成が報告されている。

フィブリリン-1 遺伝子は第15染色体にあり、フィブリリン-1 遺伝子の突然変異でマルファン症候群が起きる。遺伝子変異は個々の症例で異なる。多くの変異は、カルシウム結合性 EGF 様ドメインで起き、カルシウム結合能が失われ、タンパク質が不安定化する。そのため、フィブリリン-1 としての機能ができなくなり、微細線維形成が正常に行えず、機能する弾性系線維ができないことが原因と考えられている。マルファン症候群は常染色体性優性遺伝であるので、フィブリリン-1 の半分は正常遺伝子から形成されているにも関わらず、発症するのは正常フィブリリン-1 が微細線維を形成するものの異常タンパクによって障害されるためと考えられている³⁹⁾。また、異常フィブリリン-1 は酵素による消化・分解を受けやすく、形態異常や機能低下が生じることも推測されている。マルファン症候群の最大の問題になるのは心血管系の異常で、特に若年での突然死の原因となる大動脈解離が起こる可能性が高い。歯科関連では、高口蓋が高頻度にみられ、口蓋裂を伴うこともある。歯根長が長く、不正咬合となることが多い。

フィブリリン-2 遺伝子は第5染色体にあり、その突然変異では、マルファン症候群と類似の先天性拘縮性くも指症候群が起こる。また、フィブリリン-2 遺伝子と遺伝子連座を持ち、フィブリリン分子がカルシウムと結合する領域を獲得すると、弾性線維性仮性黄色腫が起こる。この疾患では、真皮における弾性線維

の変性とカルシウム沈着が特徴である。歯科領域での疾患はまだ報告されていない。

フィビュリン-5 遺伝子欠損マウスで、常染色体劣性皮膚弛緩症に類似する症状が観察されている。

他の構成要素の遺伝子欠損等についてはまだ明らかにされていない。遺伝子疾患では、微小欠失を起因としても複数の遺伝子の欠失を伴うので、複雑な症状を呈し、その解析は難しい。しかし、遺伝子欠損あるいは遺伝子ノックアウト・ノックダウンによる解析は、エラスチン沈着機構の解明の大きな手掛かりを与えている。

ま と め

歯根膜と歯肉は隣接する歯周組織でありながら、歯根膜ではエラスチン沈着を伴わないオキシタラン線維のみが形成される。それに対し、歯肉固有層ではエラスチン沈着が見られ、オキシタラン線維、エラウニン線維と弾性線維の全て弾性系線維が形成される。このような特異的な形成、局在パターンを示す組織は他にはない。その点からも歯周組織はエラスチン沈着機構解明の研究組織として最適な材料である。歯科・口腔領域における弾性系線維の病態と疾患はそのほんの一部しか報告されていない。しかし、弾性系線維は全身に分布し、重大な疾患とも密接に関連している。歯周組織を用いた弾性系線維の基礎的な研究の重要度は高まり、それらの成果は弾性系線維性疾患の解明と治療への基礎を築くものと考えている。

謝 辞

ここで紹介したわれわれの研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金 (14771227, 15591942, 15592195) の補助を受けて行われたものである。

文 献

- 1) Fullmer HM, Lillie RD : The oxytalan fiber : A previously undescribed connective tissue fiber. J Histochem Cytochem, 6 : 425-430, 1958.
- 2) Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y, Yajima T : Tropoelastin expression by periodontal fibroblasts. J Dent Res, 81 : 198-202, 2002.
- 3) Tsuruga E, Irie K, Yajima T : Gene expression and accumulation of fibrillin-1, fibrillin-2 and tropoelastin in cultured periodontal fibroblasts. J Dent Res, 81 : 771-775, 2002.
- 4) Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y, Yajima T : Expression of fibrillins and tropoelastin by human

- gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodont Res*, 37 : 23-28, 2002.
- 5) Tsuruga E, Yajima T, Irie K : Induction of fibulin-5 gene is regulated by tropoelastin gene, and correlated with tropoelastin accumulation in vitro. *Int J Biochem Cell Biol*, 36 : 395-400, 2004.
- 6) Greenlee TK, Ross R, Hartman JL : The fine structure of elastic fibers. *J Cell Biol*, 30 : 59-71, 1966.
- 7) Cotta-Pereira G, Guerra Rodrigo : Bittencourt-Sampaio S : Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol*, 66 : 146-148, 1976.
- 8) Sakai LY, Keene DR, Engvall E : Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol*, 103 : 2499-2509, 1986.
- 9) Zhang H, Hu W, Ramirez F : Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J Cell Biol*, 129 : 1165-1176, 1995.
- 10) Pereira L, Andrikopoulos K, Tian J, Lee SY, Keene DR, Ono R, Reinhardt DP, Sakai LY, Biery NJ, Bunton T, Dietz HC, Ramirez F : Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet*, 17 : 218-222, 1997.
- 11) Rock MJ, Cain SA, Freeman LJ, Morgan A, Mellody K, Marson A, Shuttleworth CA, Weiss AS, Kielty CM : Molecular basis of elastic fiber formation. Critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-link. *J Biol Chem*, 279 : 23748-23758, 2004.
- 12) Baldock C, Koster AJ, Ziese U, Sherratt MJ, Kadker KE, Shuttleworth CA, Kielty CM : The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J Cell Biol*, 152 : 1045-1056, 2001.
- 13) Keene DR, Maddox BK, Kuo H-J, Sakai LY, Glanville RW : Extraction of extensible beaded structures and their identification as extracellular matrix fibrillin-containing microfibrils. *J Histochem Cytochem*, 39 : 441-449, 1991.
- 14) Gibson MA, Hatzinikolas G, Davis EC, Baker E, Sutherland GR, Mecham RP : Bovin latent transforming growth factor β 1-binding protein-2 : molecular cloning, identification of tissue isoforms, and immunolocalization to elastin-associated microfibrils. *Mol Cell Biol*, 15 : 6932-6942, 1995.
- 15) Gibson MA, Hughes JL, Fanning JC, Cleary EG : The major antigen of elastin-associated microfibrils is a 31-kDa glycoprotein. *J Biol Chem*, 261 : 11429-11436, 1986.
- 16) Kielty CM, Shuttleworth CA : Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc Res Tech*, 38 : 413-427, 1997.
- 17) Gibson MA, Hatzinikolas G, Kumaratilake JS, sandberg LB, Nicholl JK, Sutherland GR, Cleary EG : Further characterization of proteins associated with elastic fiber microfibrils including the molecular cloning of MAGP-2 (MA 25). *J Biol Chem*, 271 : 1096-1103, 1996. Erratum in *J Biol Chem*, 271 : 5288, 1996.
- 18) Horrigan SK, Rich CB, Streeten BW, Li ZY, Foster JA : Characterization of an associated microfibril protein through recombinant DNA techniques. *J Biol Chem*, 267 : 10087-10095, 1992.
- 19) Daliana R, Buccioti F, Giacomello E, Deutzmann R, Volpin D, Bressan GM Colombatti A : EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/Tumor necrosis factor superfamily of proteins. *J Biol Chem*, 274 : 16773-16781, 1999.
- 20) Zanetti M, Braghetta P, Sabatelli P, Mura I, Doliana R, Colombatti A, Volpin D, Bonaldo P, Bressan G : EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol Cell Biol*, 24 : 638-650, 2004.
- 21) Doi K, Nagano A, Nakamura Y : Molecular cloning and characterization of a novel gene, EMILIN-5, and its possible involvement in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun*, 313 : 888-893, 2004.
- 22) Tsuda T, Wang H, Timpl R, Chu M-L : Fibulin-2 expression marks transformed mesenchymal cells in developing cardiac valves, aortic arch vessels, and coronary vessels. *Dev Dyn*, 222 : 89-100, 2001.
- 23) Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng C-F, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross JR J, Honjo T, Chien KR : Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature*, 415 : 171-175, 2002.
- 24) Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN : Fubulin-5 is an elastin-binding protein essential for elstic fibre development in vivo. *Nature*, 415 : 168-171, 2002.
- 25) Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, Yanagisawa H, Zuo J, Li T : Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet*, 36 : 178-182, 2004.
- 26) Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ : Oxytalan

- connective tissue fibers : A review. *J Oral Pathol*, 3 : 291-316, 1974.
- 27) Sims MR : Oxytalan fiber system of molars in the mouse mandible. *J Dent Res*, 52 : 797-802, 1973.
- 28) Yajima T, Irie K, Tsuruga E : Age-related changes of elastic system fibers in rat periodontium. *J Dent Res*, 80 : 1324, 2001.
- 29) Schwartz E, Fleischmajer R : Association of elastin with oxytalan fibers of the dermis and with extracellular microfibrils of cultured skin fibroblasts. *J Histochem Cytochem*, 34 : 1063-1068, 1986.
- 30) Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA : Elastic fibers. *J Cell Sci*, 115 : 2817-2828, 2002.
- 31) Debelle L, Tamburro AM : Elastin : molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 31 : 261-272, 1999.
- 32) Tsuruga E, Yajima T, Irie K : Microfibril-associated glycoprotein-1 and fibrillin-2 are associated with tropoelastin deposition in vitro. *Int J Biochem Cell Biol*, (in press) 2004.
- 33) Pereira L, Lee SY, Gayraud B, Andrikopoulos K, Shapiro SD, Bunton T, Biery NJ, Dietz HC, Sakai LY, Ramirez F : Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 : 3819-3823, 1999.
- 34) Bonnaure-Mallet M, Godeau G, Tixier JM, Lebon-Pelletier P, Chambon Y, Robert L, Hornebeck W : Elastin derived peptides protect elastic fibres degradation by human neutrophil elastase : in vitro and in vivo studies using a mechanically induced rat gingival inflammatory model. *J Periodont Res*, 30 : 58-65, 1995.
- 35) Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, Kielty CM : Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases : implications for connective tissue remodeling. *Biochem J*, 340 : 171-181, 1999.
- 36) Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y, Kowashi Y, Yajima T : Matrix metalloproteinase-2 degrades fibrillin-2 in cultured periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*, 74 : 1827, 2003.
- 37) Curran MF, Atkinson DL, Ewart AK, Morris CA, Leppert MF, Keating MT : The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supra-aortic stenosis. *Cell*, 73 : 159-168, 1993.
- 38) Urban Z, Peyrol UZ, Plauchu H, Zabol MT, Lebwohl M, Schilling K, Green M, Boyd CD, Csiszar K : Elastin gene deletions in Williams syndrome patients result in altered deposition of elastic fibers in skin and a subclinical dermal phenotype. *Pediatr Dermatol*, 17 : 12-20, 2000.
- 39) Milewicz DM, Urban Z, Boyd C : Genetic disorders of the elastic fiber system. *Matrix Biol*, 19 : 471-480, 2000.