

〔原 著〕

有郭乳頭上皮細胞のケラチンフィラメント

武田 正子, 小原 伸子, 鈴木 裕子

東日本学園大学歯学部口腔解剖学第II講座

(主任: 武田 正子教授)

Keratin Filaments in the Epithelial Cells of Circumvallate Papillae

Masako TAKEDA, Nobuko OBARA, Yuko SUZUKI

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry,
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Chief: Prof. Masako TAKEDA)

Abstract

Keratin filaments of epithelial cells of both the dorsal surface and the trench wall in the circumvallate papillae were studied by conventional electron microscopy and by immunohistochemistry using antikeratin antibodies.

Basal cells of the keratinized epithelium of the dorsal surface contained densely aggregated bundles of keratin filaments, and were stained with PKK2 monoclonal antibody, but not with PKK1 and PKK3. Similar dense bundles of filaments and staining with the antibodies were also found in all cell layers of nonkeratinized epithelium of the trench wall. Spinous and granular cells on the dorsal surface possessed less densely aggregated bundles of filaments than the basal cells, and were stained with PKK1 and PKK3 antibodies, but not with PKK2, in contrast to basal cells. Taste bud cells of the trench wall contained loosely aggregated bundles of keratin filaments, and were stained with PKK3, but not with PKK1 and PKK2.

The results suggest that the aggregation and distribution pattern of keratin filaments may reflect differences in keratin subtypes which are comprised in those filaments.

Key words: Keratin, filaments, epithelial cell, circumvallate papilla, taste bud

緒 言

上皮細胞の胞体には, トノフィラメントと呼ばれるデスモゾームに続く中間径 (直径約10 nm) フィラメントが分布しており, 細胞の骨格構造を作っている。このフィラメントは分子量40,000から70,000 (以下は $\times 10^3$ をKとする) の一群のケラチン蛋白からなるので, ケラチンフィラメントとも呼ばれる。このケラチンのサブタイプとして約20種類が分類されているが, 各細胞に含まれるケラチンの種類は, 組織や細胞により異なる¹⁾⁻⁷⁾。すなわち重層上皮と単層上皮では異なり, さらに同じ重層扁平上皮でも, 角化上皮と非角化上皮では異なる^{6,8-10)}。また発生と分化の過程によっても含まれるケラチンの種類は変化する¹¹⁾。

舌有郭乳頭の上皮は重層扁平上皮であるが, 表面側上皮は軽度の角化を示し, 側溝に面する上皮は角化していない。また側溝に面する上皮内には細長い単層細胞からなる味蕾が多数分布する。

この研究は, マウスを用いて有郭乳頭の表面側と側溝に面する上皮のケラチンフィラメントについて比較, 検討するため, 通常透過電子顕微鏡による観察で, フィラメントの分布, 配列状態を調べ, さらに免疫組織化学的方法により, 数種類の抗ケラチン抗体の反応を試みた。

材料と方法

1. 電子顕微鏡

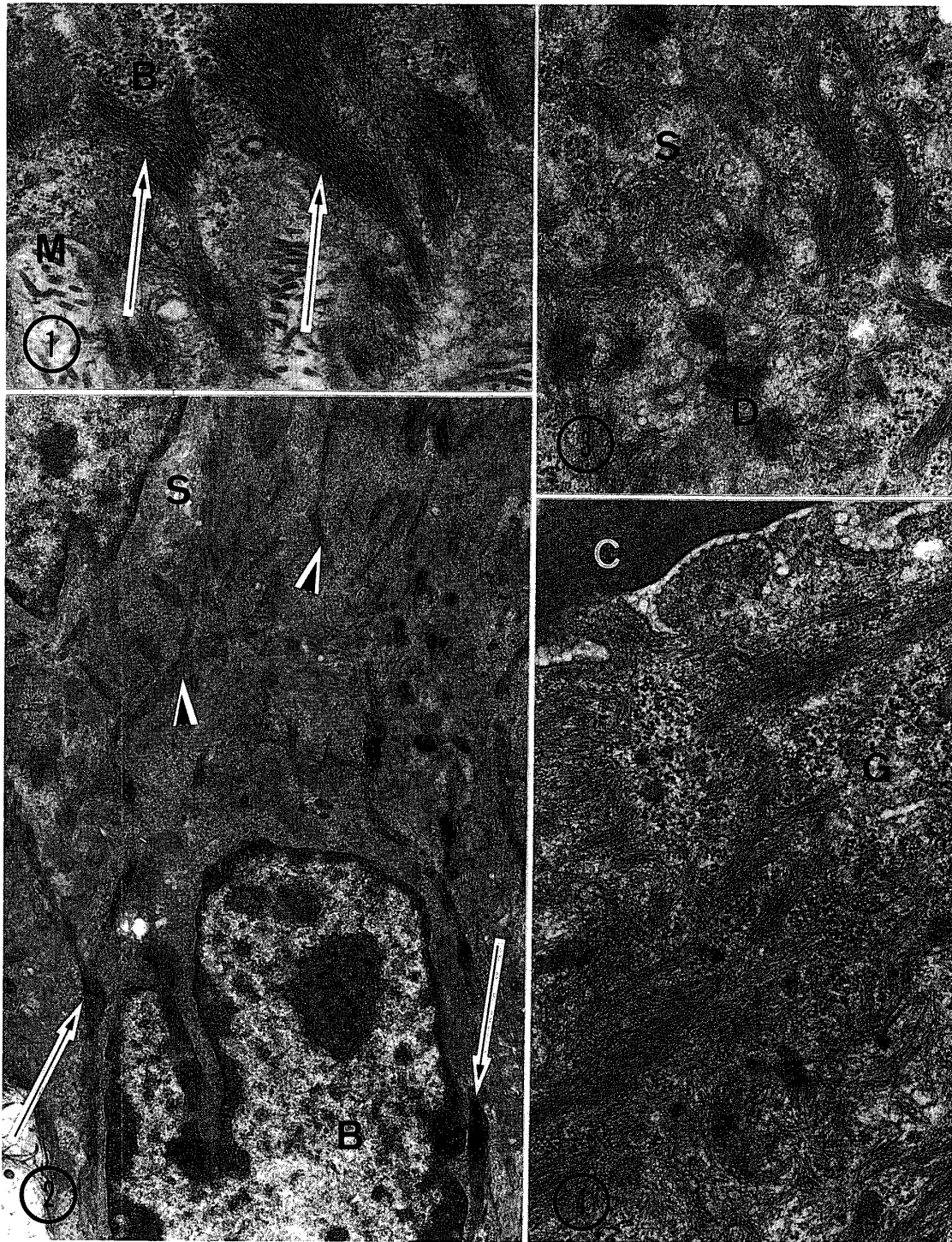
成熟 dd-マウスをクロロホルムの吸入麻醉下で, 左心室から冷2%グルタルアルデヒド, 2%パラホルムアルデヒド混液 (カコジル酸ナトリウム緩衝液 pH7.4) で還流固定した。舌の有郭乳頭を切り出し, 上述の固定液でさらに4°Cで1晩固定した後, 1% O_3O_4 (カコジル酸ナトリウム緩衝液) で4°Cで2時間, 後固定を行った。エタノール脱水後, エポン812に包埋し,

超薄切片 (60-100nm) と0.3-1.0 μ m の比較的厚い切片を切り出し, 酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色を施した。透過電子顕微鏡 (日立) の観察は, 超薄切片は75KV, 厚い切片は, 125KV の加速電圧により行った。

2. 免疫組織化学

用いた抗ケラチン抗体は次の4種類である。(1), ウシ鼻口部上皮由来のポリクローナル抗体 (58, 56, 52kD のサブユニットに強く反応し, 60, 51, 48kD のサブユニットに弱く反応, DAKO Corporation)。(2), ブタ腎上皮細胞由来の PKK1 モノクローナル抗体 (40, 45, 52.5kD のサブユニットに反応, Labsystems)。(3), ブタ腎上皮細胞由来の PKK2 モノクローナル抗体 (40, 46, 48, 54kD のサブユニットに反応, Labsystems)。(4), ブタ腎上皮細胞由来の PKK3 モノクローナル抗体 (45kD のサブユニットに反応, Labsystems)。

成熟 dd-マウスをクロロホルムによる吸入麻醉下で, 舌有郭乳頭を切り出した。ポリクローナル抗体と PKK1 モノクローナル抗体の反応には, 3%ホルマリン (リン酸緩衝液 pH7.4) に室温, 2時間固定し, リン酸緩衝液で1晩洗浄後, エタノールで脱水してパラフィンに包埋した。PKK2 と PKK3 抗体の反応には, 純エタノールで2時間固定し, キシレンで透徹後, パラフィン包埋を行った。約5 μ m に薄切した切片は, 脱パラフィン後, 100ml の0.05M トリス塩酸緩衝液に0.01-0.1g のトリプシンと0.1g の $CaCl_2$ を加えた液に, 37°Cで5-10分間作用させた。DAKO Corporation 製の PAP キットを用いて PAP 法により抗体を反応させ, 光学顕微鏡で観察した。対照標本として, 正常ウサギ血清と, 正常マウス腹水を, それぞれポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の代わりに用いた。



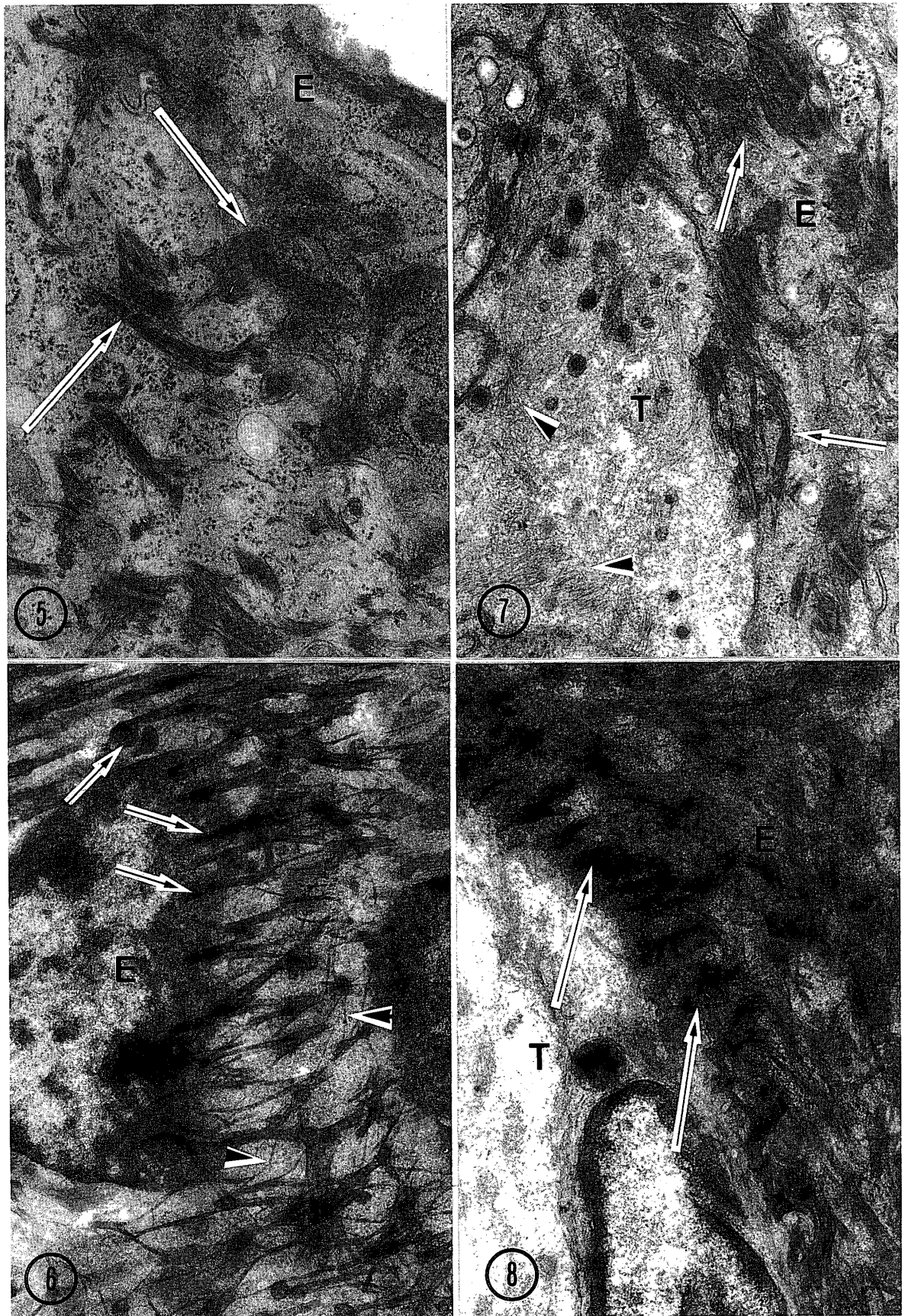
Figs.1-4. Electron micrographs from epithelial cells of the dorsal surface in the circumvallate papillae.

Fig. 1. Thin sections observed at an accelerating voltage of 75kV. A basal cell (B) contains densely aggregated bundles of tonofilaments (arrows). M basement membrane. $\times 28,000$

Fig. 2. Thick sections ($0.5\mu\text{m}$) observed at an accelerating voltage of 125kV. The filament bundles (arrowheads) in a spinous cell (S) are lower in electron-density than those (arrows) in a basal cell (B). $\times 8,000$

Fig. 3. Thin sections. Upper spinous cells (S) contain loosely aggregated bundles of filaments. D desmosome. $\times 28,000$

Fig. 4. Thin sections. Granular cells (G) contain loosely aggregated bundles of filaments. C cornified cell. $\times 28,000$



Figs. 5-8 Legend on the opposite page.
Electron micrographs from epithelial and taste bud cells of the trench wall in the circumvallate papillae.

Table 1 Reactivity of antikeratin antibodies on the epithelium of circumvallate papillae

Antibodies	Keratin subunits	Staining						Taste bud
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	
Polyclonal	52, 56, 58kD	+	+	+	+	+	+	+
Monoclonal								
PKK1	40, 45, 52.5kD	-	-	+	+	-	-	-
PKK2	40, 46, 48, 54kD	+	+	-	±	+	+	-
PKK3	45kD	-	-	+	+	-	-	+

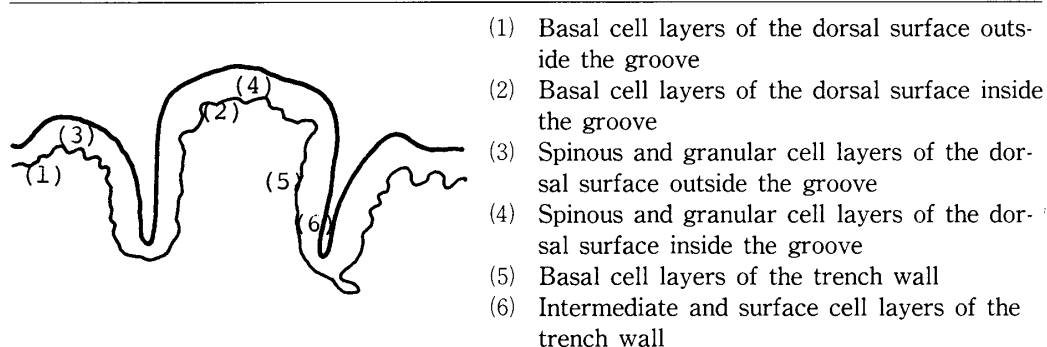


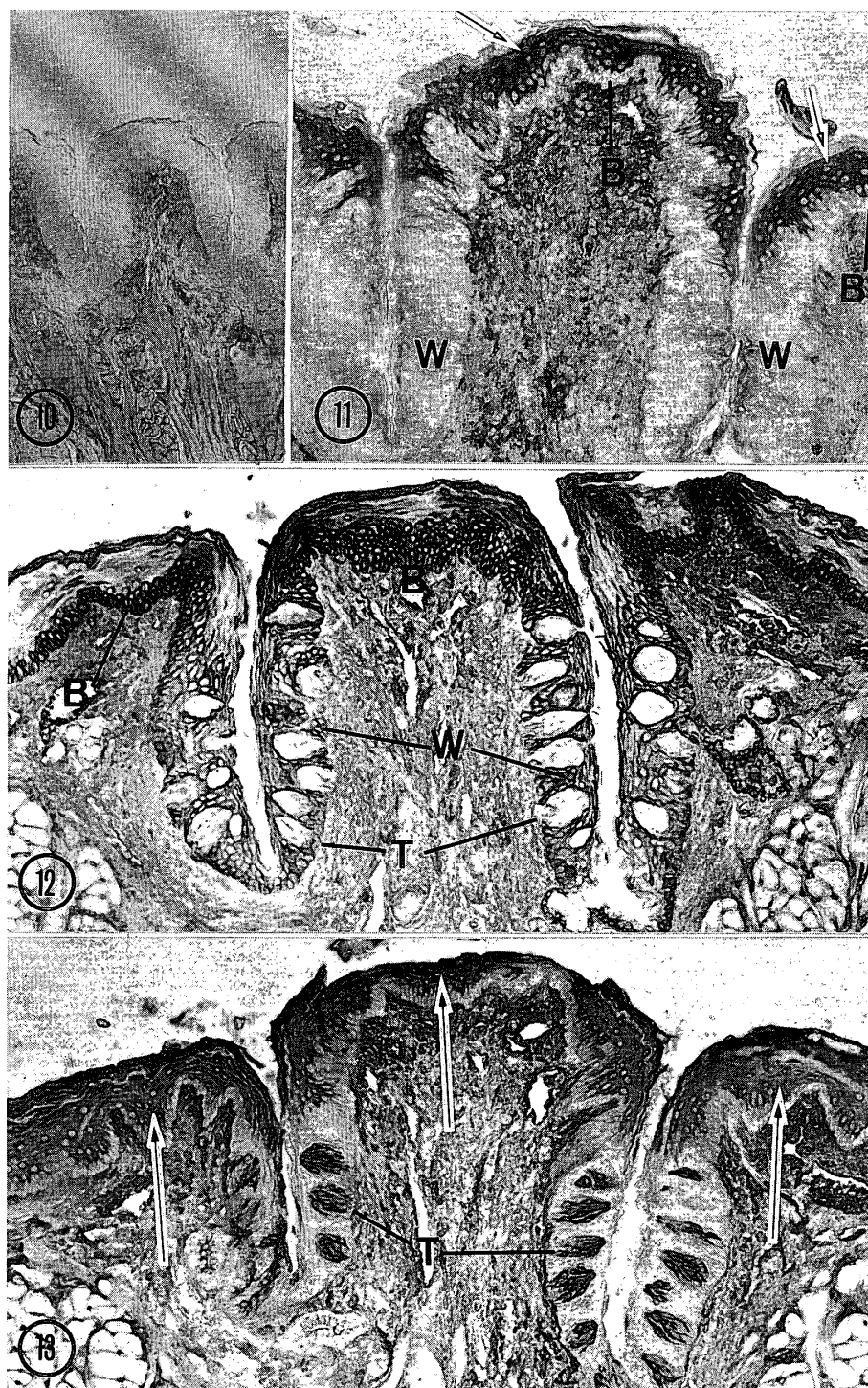
Fig. 9. Immunohistochemical staining of the circumvallate papillae with polyclonal antikeratin antibodies against bovine muzzle tissue. Note the staining of all epithelial and taste bud (T) cells. $\times 110$

Fig. 5 Thin sections. Epithelial cells of the surface layer (E) possess extremely electron-dense bundles of filaments (arrows). Dense cement-like material fills the spaces between the filaments. $\times 29,000$

Fig. 6. Thick sections ($0.6\mu\text{m}$). In the epithelial cells of the intermediate layer (E), the dense bundles of filaments stretch in a straight line (arrows) from desmosomes to nucleus, or in a wavy manner (arrowheads) from desmosome to neighboring desmosome. $\times 9,000$

Fig. 7. Thin sections. Taste bud cells (T) possess less densely aggregated bundles of filaments (arrowheads) than those (arrows) in the surrounding epithelial cells (E). $\times 29,000$

Fig. 8. Thick sections ($0.6\mu\text{m}$). Epithelial cells surrounding a taste bud (T) possess extremely numerous and dense bundles of filaments (arrows). E epithelial cells. $\times 15,000$



Figs.10-13. Immunohistochemical staining of the circumvallate papillae with monoclonal antikeratin antibodies against pig kidney epithelial cell line.

Fig.10. Control specimens using mouse ascites. Staining is not detected in the epithelial and taste bud cells. $\times 60$

Fig.11. PKK1 antibody. Note the staining of spinous and granular cell layers (arrows) and lack of staining of basal cell layers (B) of the dorsal surface. All layers of the trench wall epithelium (W) are not stained. $\times 130$

Fig.12. PKK2 antibody. Note the staining of all layers of the trench wall epithelium (W) and basal cell layers (B) of the dorsal surface. Taste bud cells (T) are not stained. $\times 130$

Fig.13. PKK3 antibody. Note the staining of spinous and granular cell layers (arrows) of the dorsal surface. Taste bud cells (T) are stained in contrast to PKK2. $\times 130$

結 果

1. 電子顕微鏡

有郭乳頭の表面側の重層扁平上皮は、溝の内外とも軽度に角化している。その基底細胞のトノフィラメントは束を形成して胞体全体に波状に分布し、ヘミデスモゾームおよびデスモゾームに終る。フィラメント束は稠密で太く、電子密度が高い (Fig.1)。有棘細胞になると、束は小型になり、不規則に走行し、束を構成するフィラメントがまばらになるため、基底細胞に比べて電子密度が低下する。これは $0.5-1.0\mu\text{m}$ の厚い切片の観察で良くわかる (Fig.2)。有棘細胞から顆粒細胞へ移行するに従い、フィラメント束はほどける傾向を示し、一部のフィラメントは網目状に密に錯綜する。角化層では、高電子密度の均質な物質の中に密にフィラメントが詰まっている (Figs.3, 4)。

側溝に面する内外両壁の重層扁平上皮は、表面に近いわずかの部分が錯角化の状態であるが、それ以外の大部分は角化していない。ここには多数の味蕾が分布する。上皮の基底層、中間層、表層の全層の細胞のトノフィラメントは束を形成する。その束は稠密で、表面側上皮の基底細胞の束よりもさらに高い電子密度を呈する。フィラメント間には、高電子密度のセメント様の均質な物質が埋まっており、個々のフィラメントの識別は困難である。このようなフィラメント束は特に中間層に数が多い (Figs.5,6)。厚い切片で観察すると、束は核周囲部からデスモゾームへ太く直線的に伸びるものと、デスモゾームからデスモゾームへ細く波状に伸びるものが見られる (Fig.6)。また味蕾をとり囲む上皮細胞には、非常に多量のフィラメント束が放射状に並んでいる (Fig.8)。味蕾の分化した細胞は、基底膜から味孔まで細長く伸びているが、胞体には少数のまばらなトノフィラメント束が見られる (Fig.7)。

2. 免疫組織化学

抗ケラチン抗体による反応の結果をまとめたものが表1である。ウシ鼻口部上皮のケラチンに対するポリクローナル抗体の反応では、有郭乳頭上皮は、表面側も側溝に面する側も、全層にわたってすべて陽性を示した。同様に味蕾の細胞もすべて陽性を示した (Fig.9)。PKK1とPKK2モノクローナル抗体では、上皮は部位によりほぼ反対の反応を示した。すなわち、表面側の角化上皮では、基底層はPKK1抗体に陰性で、PKK2抗体には陽性、有棘層と顆粒層はPKK1抗体に陽性で、PKK2抗体には側溝より外側では陰性、内側では弱陽性であった。側溝に面した非角化上皮では、基底層から表層まで全層にわたってPKK1抗体には陰性、PKK2抗体には陽性であった。PKK3抗体は、PKK1抗体と全く同じ反応を示した。味蕾細胞は、PKK1とPKK2抗体に陰性であったが、PKK3抗体には陽性であった (Figs.11-13)。

正常ウサギ血清を抗体の代わりに用いた対照標本は、有郭乳頭全体が陰性であった。一方、正常マウス腹水を用いた対照標本では、実験動物としてマウスを用いたため、結合組織の部分が弱陽性を示したが、上皮の部分は味蕾も含めて陰性であった (Fig.10)。

考 察

マウスの有郭乳頭の側溝に面した非角化上皮細胞のトノフィラメントは非常に高電子密度の稠密な束を多数形成しており、中でも味蕾周囲の上皮細胞にはきわめて多数のフィラメント束が見られた。一方、非角化上皮であるヒトの下唇の内側の粘膜上皮細胞のトノフィラメントは数が少なく、ほとんど束を形成せず網目状に分布することが報告されている¹²⁾。これは、有郭乳頭の側溝に面した上皮細胞が、ここに多数存在する味蕾を支持する特別の機能を負っているために、他の非角化上皮とは異なるフィラメント

の配列, 分布状態を示すのではないかと考えられる。同じような高電子密度の稠密なトノフィラメント束は, 高度に角化しているハムスターの糸状乳頭後面部や, ラットの硬口蓋, ヒトの皮膚にも見られるが¹³⁾⁻¹⁵⁾, 糸状乳頭では, 作用する外力に対して後方から糸状乳頭前面部を支持する支柱の役目を後面部が担うものと考えられている¹⁵⁾。

軽度の角化を示すラットの頬粘膜や軟口蓋の上皮細胞のトノフィラメントは, 不規則に走行する電子密度の低い束を形成するが^{14,16)}, マウスの有郭乳頭の軽度に角化した表面側上皮も, これに似たフィラメントの像を示した。

ヒト皮膚では, 基底細胞に50kDと58kDのケラチンが含まれ, 有棘, 顆粒細胞にはこれらに56.5kDと65-67kDのケラチンが加わり, さらに角化層では55-58kDと63-65kDのケラチンが含まれる^{9,17,18)}。有郭乳頭の表面側上皮は, 基底細胞層と, 有棘, 顆粒細胞層とでは, PKK1, PKK2, PKK3の各モノクローナル抗体に対する反応が異なっていた。このことは, 基底細胞から有棘, 顆粒細胞への分化にともなって, 含まれるケラチン蛋白のサブユニット分子が変化したことを示すものと思われる。味蕾は, 周囲の上皮細胞と違って, 重層ではなく単層細胞からなっているが^{19,20)}, 周囲上皮と反対に, PKK2抗体陰性, PKK3抗体陽性を示した。PKK3抗体は, 45kDケラチン (Mollらの分類によるNo.18)に特異的に反応するが, このケラチンは種々の単層上皮に含まれる^{6,8)}。さらに触覚細胞であるメルケル細胞にも含まれる²¹⁾。味蕾細胞は, 周囲の上皮細胞から由来するものと考えられるが^{22,23)}, 分化した味蕾細胞は, 周囲上皮細胞とは異なる種類のケラチンを含むようになると思われる。

有郭乳頭の側溝に面する上皮の全層の細胞と, 表面側上皮の基底細胞は, 高電子密度の稠密なケラチンフィラメント束を有し, PKK1と

PKK3抗体に陰性, PKK2抗体に陽性を示した。一方, 表面側上皮の有棘, 顆粒細胞は低電子密度のまばらなフィラメント束を持ち, PKK1とPKK3抗体に陽性で, PKK2抗体には陰性であった。味蕾細胞もまた低電子密度のまばらなフィラメント束を含み, PKK1とPKK2抗体に陰性で, PKK3抗体に陽性であった。すなわち, 稠密なフィラメント束を持つ細胞は, PKK2抗体陽性で, まばらなフィラメント束を持つ細胞は, PKK1またはPKK3抗体に陽性であった。このことからケラチンフィラメントの集合, 配列の状態と, それを構成するケラチン蛋白の種類との間に密接な関連があることが推測される。

ケラチン線維の形成は, 酸性グループのケラチン(タイプI, 40-57kD)と, 中性から塩基性グループのケラチン(タイプII, 53-67kD)から少なくとも1分子ずつ以上が参加して対を作る。これをプロトフィラメント(直径2-3nm)と呼び, それがいくつかが集まって直径10nmのフィラメントを形成する²⁴⁾⁻²⁸⁾。

ケラチンのポリペプチド鎖の中央の α ヘリックス部分が, タイプIとタイプIIを決定するが, 両端のランダム構造部分は, フィラメントの表面に突出し, 分化や組織によって特徴的な差がある^{24,29)}。したがって, ケラチンフィラメントの集合, 配列を規制, 調節しているのは, 組織に特異的な構造を持つランダム部分であることが考えられる。さらにこれに加えて, フィラメント周囲のケラチンフィラメント関連蛋白質が関与しているのかもしれない。現在, ケラチンフィラメント関連蛋白質として知られているものに, 角化層のフィラメント間を埋める基質蛋白質であるFilaggrinがあるが³⁰⁾, 角化層以外の上皮細胞に含まれる関連蛋白質については, まだほとんど解明されていない。

今回の結果から, フィラメントを構成するケラチン分子の違いが, 組織や細胞に特異的なケ

ラチンフィラメントの集合、配列状態を規制する要因の1つとなるのではないかと推測される。

結 論

マウスの舌有郭乳頭の表面側と側溝に面する側の上皮細胞のケラチンフィラメントについて、電子顕微鏡と抗ケラチン抗体を用いた免疫組織化学により検索した。

1. 表面側の角化上皮の基底細胞は、高電子密度の稠密なケラチンフィラメント束を持ち、PKK2モノクローナル抗体に陽性で、PKK1とPKK3抗体に陰性であった。側溝に面した非角化上皮の全層の細胞も、類似の稠密なフィラメント束を有し、各抗体にも同様の反応を示した。
2. 表面側の有棘、顆粒細胞は、低電子密度のまばらなフィラメント束を持ち、基底細胞と反対に、PKK1とPKK3抗体に陽性で、PKK2抗体には陰性ないし弱陽性であった。これに似ているのが味蕾細胞で、まばらなフィラメント束を持ち、PKK3抗体に陽性で、PKK1とPKK2抗体に陰性であった。
3. 以上より、ケラチンフィラメントの集合、配列の状態は、フィラメントを構成するケラチン蛋白の種類と密接な関係にあるのではないかと推測される。

文 献

1. Franke, W. W., Weber, K., Osborn, M., Schmid, E. and Freudenstein, C.: Antibody to prekeratin: Decoration of tonofilament-like arrays in various cells of epithelial character. *Exp. Cell Res.*, 116 : 429-445, 1978.
2. Franke, W. W., Appelhans, B., Schmid, E., Freudenstein, C., Osborn, M. and Weber, K.: Identification and characterization of epithelial cells in mammalian tissues by immunofluorescence microscopy using antibodies to prekeratin. *Differentiation*, 15 : 7-25, 1979.
3. Sun, T. -T., Shih, C. and Green, H.: Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76 : 2813-2817, 1979.
4. Schlegel, R., Banks-Schlegel, S. and Pinkus, G. S.: Immunocytochemical localization of keratin in normal human tissues. *Lab. Inv.*, 42 : 91-96, 1980.
5. Denk, H., Krepler, R., Lackinger, E., Artlieb, U. and Franke, W. W.: Biochemical and immunocytochemical analysis of the intermediate filament cytoskeleton in human hepatocellular carcinomas and in hepatic neoplastic nodules of mice. *Lab. Invest.*, 46 : 584-596, 1982.
6. Moll, R., Franke, W. W. and Schiller, D. L.: The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31 : 11-24, 1982.
7. Murase, N., Fukui, S. and Mori, M.: Heterogeneity of keratin distribution in the oral mucosa and skin of mammals as determined using monoclonal antibodies. *Histochemistry*, 85 : 265-276, 1986.
8. Tseng, S. C. G., Jarvinen, M. J., Nelson, W. G., Huang, J. -W., Woodcock-Mitchell, J. and Sun, T. -T.: Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: Monoclonal antibody study. *Cell*, 30 : 361-372, 1982.
9. Sun, T. -T., Eichner, R., Nelson, W. G. and Tseng, S. C. G.: Keratin classes: Molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J. Invest. Derm.*, 81 : 109s-115s, 1983.
10. Eichner, R., Bonitz, P. and Sun, T. -T.: Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point and mode of expression. *J. Cell Biol.*, 98 : 1388-1396, 1984.
11. Banks-Schlegel, S. P.: Keratin alterations during embryonic epidermal differentiation: A presage of adult epidermal maturation. *J. Cell Biol.*, 93 : 551-559, 1982.
12. Zelickson, A. S. and Hartmann, J. F.: An electron microscope study of normal human non-keratinizing oral mucosa. *J. Invest. Derm.*, 38 : 99-106, 1962.

13. Brody, I.: The ultrastructure of the tonofibrils in the keratinization process of normal human epidermis. *J. Ultrast. Res.* 4: 264-297, 1960.
14. Hayward, A. F., Hamilton, A. I. and Hackemann, M. M. A: Histological and ultrastructural observations on the keratinizing epithelia of the palate of the rat. *Archs. Oral Biol.*, 18: 1041-1057, 1973.
15. 小田島哲世, 賀来亨: 実験的ハムスター舌癌形成過程の超微形態学的研究. I. 正常舌粘膜上皮の超微構造; 特に角化について. *札幌医誌*, 47: 225-243, 1978.
16. Appleton, J. and Tyldesley, W. R.: Observations on the ultrastructure of the buccal epithelium of the rat. *Archs. Oral Biol.*, 16: 1071-1088, 1971.
17. Woodcock-Mitchell, J., Eichner, R., Nelson, W. G. and Sun, T.: Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.*, 95: 580-588, 1982.
18. Skerrow, D. and Skerrow, C. J.: Tonofilament differentiation in human epidermis, isolation and polypeptide chain composition of keratinocyte subpopulations. *Exp. Cell Res.*, 143: 27-35, 1983.
19. Takeda, M. and Hoshino, T.: Fine structure of taste buds in the rat. *Arch. Histol. Jap.*, 37: 395-413, 1975.
20. Takeda, M., Suzuki, Y. and Shishido, Y.: Effects of colchicine on the ultrastructure of mouse taste buds. *Cell Tiss. Res.*, 242: 409-416, 1985.
21. Moll, R., Moll, I. and Franke W. W.: Identification of Merkel cells in human skin by specific cytokeratin antibodies. *Differentiation*, 28: 136-154, 1984.
22. Beidler, L. M. and Smallman, R. L.: Renewal of cells within taste buds. *J. Cell Biol.* 27: 263-272, 1965.
23. Takeda, M., Obara, N. and Suzuki, Y.: Intermediate filaments in mouse taste bud cells. *Arch. Histol. Cytol.*, 51: 99-108, 1988.
24. Franke, W. W., Schiller, D. L., Hatzfeld, M. and Winter, S.: Protein complexes of intermediate-sized filaments: Melting of cytokeratin complexes in urea reveals different polypeptide separation characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 7113-7117, 1983.
25. Eichner, R., Rew, P., Engel, A. and Aebi, U.: Human epidermal keratin filaments: Studies on their structure and assembly. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 455: 381-402, 1985.
26. Fuchs, E., Hanukoglu, I., Marchuk, D., Grace, M. P. and Kim, K. H.: The nature and significance of differential keratin gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 455: 436-450, 1985.
27. Sun, T. -T., Tseng, S. C. G., Huang, A. J. -W., Cooper, D. and Eichner, R.: Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: A review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 455: 307-329, 1985.
28. Eichner, R., Sun, T. -T and Aebi, U.: The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J. Cell Biol.*, 102: 1767-1777, 1986.
29. Steven, A. C., Trus, B. L., Hainfeld, J. F., Wall, J. S. and Steinert, P. M.: Conformity and diversity in the structures of intermediate filaments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 455: 371-380, 1985.
30. Dale, B. A., Resing, K. A. and Lonsdale-Eccles, J. D.: Filaggrin: A keratin filament associated protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 455: 330-342, 1985.