

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09582

研究課題名(和文) アメロチンによる歯肉接合上皮を介した歯面接着作用の歯周病治療への応用

研究課題名(英文) An application of dento-gingival attachment by amelotin via gingival junctional epithelium

研究代表者

中山 洋平 (NAKAYAMA, Yohei)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：30434088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉接合上皮(JE)は、歯周ポケット底部で体内外を閉鎖している部分であり、歯周組織内へ侵入する歯周病原菌や菌の産生する起炎物質からの生体応答を担っている。歯肉接合上皮と歯面への接着機構は、口腔内の炎症である慢性歯周炎のみならず、恒常的に近接する細胞間での調節が行われていると考えられている。そこで今回、歯肉上皮細胞中の接合上皮特異的遺伝子群の発現が、歯根膜線維芽細胞およびセメント芽細胞から萌出される液成因子からどのような調節を受けているかを検索するため、細胞間相互作用による歯肉接合上皮特異的遺伝子の発現変化を解析し、歯肉接合上皮の恒常性の維持に関連する因子について分析および考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯肉上皮細胞において歯肉接合上皮特異的遺伝子であるAmtn発現レベルは、セメント芽細胞(HCEM)および歯根膜細胞(HPL)との共培養によって減少した。LC-MS分析およびKEGG分析の結果、Amtn遺伝子発現抑制作用としてヒポキサンチン関連因子、促進作用としてヒスチジン関連因子が候補として検索された。HCEMおよびHPLとの共培養により、ヒポキサンチンおよびヒスチジン関連のシグナリングが関与し、歯肉上皮細胞中のAmtn遺伝子発現が調節される可能性が示唆された。これらの結果は、セメント質および歯根膜組織中の液性因子によって、歯肉接合上皮特異的発現遺伝子の調節機構が存在する可能性を示していた。

研究成果の概要(英文)：Junctional epithelium (JE) localizes the entrance of the body thorough periodontal pockets, play a role in closing the entrance and responding against infiltration of periodontal pathogens. The mechanism that maintains attachments between JE and tooth surface may be influenced by chronic periodontitis, but also constitutively controlled by intercellular interactions with adjacent cells in periodontal tissue, such as periodontal ligaments (HPL) and cementum (HCEM). In this study, to investigate the mechanism that is controlled by intercellular interaction with HPL and HCEM respectively, we examined the change of JE specific gene expressions in gingival epithelial cells by the intercellular interaction and analyzed the candidates the stimulatory and inhibitory factors for the JE specific gene expressions.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯肉接合上皮 歯周組織 細胞間間接的相互作用 アメロチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アメロチン (AMTN) は、エナメル質形成の分泌期後期および成熟期エナメル芽細胞から分泌されるエナメルタンパク質である。私は以前 AMTN 遺伝子過剰発現および欠失マウスを分析し、AMTN がエナメル質の成熟に関与することを明らかにした。

AMTN は成熟期エナメル芽細胞基底層のみならず、歯肉接合上皮に局在し、また *in vitro* において、AMTN が骨芽細胞様細胞の骨結節を誘導することから、歯周組織の発生および歯周硬組織の石灰化、エナメル質との接着を含む恒常性の維持に関与する可能性がある。

歯肉接合上皮は歯面とヘミデスモゾームで結合し、早い細胞のターンオーバーで恒常性を維持していると考えられている。我々は以前、ヒト炎症時歯肉における *Amtn* 遺伝子発現の変化を検索し、正常歯肉と比較して炎症性歯肉において *Amtn* 遺伝子発現が増加することを示した。また炎症性サイトカインに作用させた歯肉線維芽細胞や歯肉上皮細胞においても、*Amtn* mRNA レベルが増加することを確認した。また、代表的な歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg* 菌) 感染マウスにおける AMTN 遺伝子の発現変化を調べたところ、感染初期で AMTN タンパク質は歯肉接合上皮で一過性に増加するが、接合上皮の破壊と伴にその局在は消失することを明らかにした。

炎症時に起こるアポトーシスを想定して、トランスフォーミング成長因子 (TGF- β 1) 刺激下における *Amtn* 遺伝子発現の変化とその転写調節機構を検索した。TGF β 1 に誘導される Smad3 がアメロチン遺伝子プロモーター中の Smad 応答配列に結合し、*Amtn* 遺伝子発現が一過性に増加することを示した。さらに *Smad3* 遺伝子ノックアウトマウスの接合上皮では、AMTN 発現がやや弱いことを免疫染色法にて確認した。

組織発生や腫瘍転位および炎症時に生じる上皮間葉移行時における *Amtn* 遺伝子の発現および局在の変化も検索した。その結果、TGF- β 1 誘導および SNAI2 過剰発現による歯肉上皮細胞における上皮間葉移行時において、TGF- β 1 誘導 *Amtn* 遺伝子発現が SNAI2 の負のフィードバックにより調節されることを示した。これらの結果は、AMTN が歯肉接合上皮の発生や生体防御反応として調節されていることを示唆するものであるが、他の歯周組織との関連性については触れていない。

2. 研究の目的

歯肉接合上皮に発現するタンパク質の発現の変化は、慢性炎症や歯肉切除術後の治癒に焦点をあてていくつか報告がある。ODAMは歯牙移動時や、歯肉切除後の治癒とともにその発現が回復することが報告されている。対照的に、歯牙全周を歯肉切除した場合、完全な接合上皮の再生は認めなかったとする報告もされている。歯肉接合上皮局在するタンパク質の1つである FDC-SPは、LPS処理したラットの慢性歯周炎モデルにおいて、一時的に発現が消失するが、炎症前後にその発現は回復することが報告されている。これらの見解は、残存した接合上皮が、炎症や手術で欠如した組織を再生させることを示唆している。

AMTN、ODAMおよびFDC-SPは歯肉接合上皮に限局して発現することを免疫染色法で示されている。しかし、この限局した発現を調節する分子メカニズムは明らかではない。歯肉接合上皮に隣接する歯周組織は、歯根膜とセメント質である。これらの発生・構造的維持に関与する歯根膜線維芽細胞およびセメント芽細胞と、歯肉上皮細胞の相互作用下における、接合上皮特異的遺伝子群の発現変化を調べた報告はない。そこで今回、細胞間相互作用による歯肉接合上皮特異的遺伝子の発現変化を検索するため、細胞培養装置 (NICOLシステム) を使用した。歯肉上皮細胞中のこれらの遺伝子発現が、歯根膜線維芽細胞およびセメント芽細胞から萌出される液成因子からどのような調節を受けているかを解析し、歯肉接合上皮の恒常性の維持に関連する因子について考察した。

3. 研究の方法

細胞培養—ヒト歯肉上皮細胞(TIGKs-hTERT)の培養には,Keratinocyte Growth Kit(ATCC),1% PC・ST 含有,Dermal Cell Basal Medium 培地(ATCC)を用いた。ヒトセメント芽細胞(HCEM-hTERT)およびヒト歯根膜細胞(HPL-hTERT)には,1%FCS,1% PC・ST 含有, MEM- α 培地(GIBCO)を使用した。共培養システムには,NICO1 水平接続型共培養システムを使用した。共培養 24 および 48 時間後に,TIGKs 細胞の形態を観察した。

RNA 抽出—細胞が 70% コンフルエントになった後,TIGKs 細胞 - HCEM および TIGKs 細胞 - HPL の組み合わせで NICO1 の well を水平的に接続し,接続 24 および 48 時間後に細胞を回収して全 RNA を RNA 抽出キット(ISOGEN[®])にて抽出した。NICO1 システムの well サイズが小さいため,3 well の細胞を合わせたものを 1 サンプルとした。

Real-time PCR—抽出した全 RNA を ExScript RT reagent kit を用いて,cDNA を合成した。cDNA を SYBR Green qPCR Kit を用いて,Real-time PCR を行った。プライマーには歯肉接合上皮のマーカである AMTN,ODAM,FDC-SP,ラミニン β 3,サイトケラチン 19(CK19) および細胞増殖マーカーである PCNA を用いた。

蛍光免疫染色法—共培養後の TIGKs 細胞中の AMTN タンパク質発現レベルの変化は蛍光免疫染色法にて比較した。Falcon[®]CultureSlides and Corning[®]BioCoat[™]を使用した。培養細胞は 4%PFA で固定,0.5% Triton[®]X-100 で透過処理した。1%BSA で 20 分ブロッキングした。1 次抗体および 2 次抗体は室温で 1 時間それぞれ作用させた。2 次抗体は室温で 40 分間反応させた。LSM 5 EXCITER(Carl Zeiss)でイメージングした。

液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)—共培養により *Amtn* 遺伝子発現を調節する液性因子を検索する目的で,共培養時の細胞培養液中の代謝産物を用いて LC-MS を行った。統計解析には MetaboAnalyst と KEGG データベースを使用した。

TIGKs 細胞における *Amtn* mRNA 量および AMTN タンパク質レベルは,HCEM および HPL と共培養によって減少した。LC-MS 分析の結果,HCEM との共培養で 43 種,HPL との共培養で 33 種の代謝産物(分子式基準)に,有意な 2 倍以上の増加を認め,HCEM との共培養で 20 種,HPL との共培養で 27 種の代謝産物(分子式基準)に 2 倍以上の減少を認めた。KEGG 分析の結果,*Amtn* 遺伝子抑制作用としてヒポキサンチン関連,促進作用としてヒスチジン関連因子が候補として検索された。

4. 研究成果

セメント芽細胞および歯根膜細胞との共培養により,ヒポキサンチンおよびヒスチジン関連のシグナリングが関与し,歯肉上皮細胞中の *Amtn* 遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。これらの結果は,セメント質および歯根膜組織中の液性因子によって,歯肉接合上皮特異的発現遺伝子の調節機構が存在する可能性を示した。しかし,これらの代謝産物が直接的に細胞間間接的相互作用に関わるかは不明なままであるため,相互作用に関わる因子の同定が今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakayama Y, Inoue E, Kato A, Iwai Y, Takai-Yamazaki M, Tsuruya Y, Yamaguchi A, Noda K, Nomoto T, Ganss B, Ogata Y.	4. 巻 108
2. 論文標題 Follicular dendritic cell-secreted protein gene expression is upregulated and spread in nifedipine-induced gingival overgrowth.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 532-544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-020-00483-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mezawa M, Tsuruya Y, Yamazaki-Takai M, Takai H, Nakayama Y, McCulloch CA, Ogata Y.	4. 巻 61
2. 論文標題 IL-1 enhances cell adhesion through laminin 5 and 4 integrin in gingival epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 491-497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.18-0434.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamazaki M, Iwai Y, Noda K, Matsui S, Kato A, Takai H, Nakayama Y, Ogata Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Tumor necrosis factor- stimulates human amelotin gene transcription in gingival epithelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 351-361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00011-017-1126-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki M, Mezawa M, Noda K, Iwai Y, Matsui S, Takai H, Nakayama Y, Ogata Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Transcriptional regulation of human amelotin gene by interleukin-1 .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 974-985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12434.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Y, Matsui S, Noda K, Yamazaki M, Iwai Y, Ganss B, Ogata Y.	4. 巻 60
2. 論文標題 TGF 1-induced Amelotin gene expression is downregulated by Bax expression in mouse gingival epithelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 232-241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.17-0271.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Noda K, Yamazaki M, Iwai Y, Matsui S, Kato A, Takai H, Nakayama Y, Ogata Y.	4. 巻 60
2. 論文標題 IL-1 and TNF- regulate mouse amelotin gene transcription in gingival epithelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 388-398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.17-0388.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwai Y, Noda K, Yamazaki M, Mezawa M, Takai H, Nakayama Y, Kitagawa M, Takata T, Ogata Y.	4. 巻 60
2. 論文標題 Effects of interleukin-1 on human follicular dendritic cell-secreted protein gene expression in periodontal ligament cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 601-610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.17-0473.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Y, Kobayashi R, Iwai Y, Noda K, Yamazaki M, Kurita-Ochiai T, Yoshimura A, Ganss B, Ogata Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 C/EBP and YY1 bind and interact with Smad3 to modulate lipopolysaccharide-induced amelotin gene transcription in mouse gingival epithelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 276-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12566.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakayama Y, Tsuruya Y, Noda K, Yamazaki-Takai M, Iwai Y, Ganss B, Ogata Y.	4. 巻 234
2. 論文標題 Negative feedback by SNAI2 regulates TGF 1-induced amelotin gene transcription in epithelial-mesenchymal transition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 11474-11489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.27804.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山口亜利彩, 鶴屋祐人, 能田佳祐, 高井瑞穂, 目澤 優, 高井英樹, 中山洋平, 小方頼昌
2. 発表標題 炎症性サイトカインがエクソソームに及ぼす影響
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴屋祐人, 山口亜利彩, 能田佳祐, 高井瑞穂, 目澤 優, 高井英樹, 中山洋平, 小方頼昌
2. 発表標題 炎症性サイトカインによるODAM転写調節機構の解析
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高井瑞穂, 能田佳祐, 岩井泰伸, 目澤 優, 高井英樹, 中山洋平, 小方頼昌
2. 発表標題 miRNA-200bはヒト上皮細胞におけるアメロチン遺伝子発現を抑制する
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能田佳祐, 高井瑞穂, 岩井泰伸, 目澤 優, 高井英樹, 中山洋平, 小方頼昌
2. 発表標題 miRNA150は歯肉上皮細胞においてMKP-5を介してマウスアメリチン遺伝子発現を調節する
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山洋平, 鶴屋祐人, 能田佳祐, 高井瑞穂, 岩井泰伸, 小方頼昌
2. 発表標題 SNAI2は上皮間葉移行におけるTGF 1誘導AMTN遺伝子発現を負に調節する
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山洋平, 能田佳祐, 山崎瑞穂, 岩井泰伸, 小方頼昌
2. 発表標題 歯肉上皮細胞におけるTGF 1誘導AMTN遺伝子発現はBaxによって抑制される
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山洋平, 井上英子, 加藤彩子, 岩井泰伸, 高井瑞穂, 鶴屋祐人, 山口亜利彩, 能田佳祐, 小方頼昌
2. 発表標題 ニフェジピンによる薬物性歯肉増殖症歯肉における接合上皮特異的遺伝子の発現
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山洋平, 鶴屋祐人, 山口亜利彩, 高井瑞穂, 小方頼昌
2. 発表標題 歯肉上皮細胞における細胞間相互作用によるアメロチン遺伝子発現の調節
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小方 頼昌 (OGATA Yorimasa) (90204065)	日本大学・松戸歯学部・教授 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関