

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20791630
研究課題名 (和文) 歯周組織における FDC-SP とスタセリン遺伝子およびタンパク発現に関する研究
研究課題名 (英文) The study of gene and protein expression of FDC-SP and statherin about periodontal tissue.
研究代表者
横井 隆政 (YOKOI TAKAMASA)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：40469010

研究成果の概要 (和文)：

GCF サンプルからスタセリン発現を確認することが困難であり、抗体の生成も試みたが精度の高い抗体作成ができなかった。現在も精度の高い抗体作成を行っているところである。

また、ヒト組織サンプル凍結切片作成に関しては幼弱永久歯を得ることが非常に困難を極めている状況である。いくつかサンプルを得ることができたため、今後 in situ hybridization および免疫染色を行ない発現を確認していく予定である。

研究成果の概要 (英文)：

GCF is difficult to determine from the sample STATHERIN expression could not tried to create precise antibody generation of antibodies. Antibody is where we are creating accurate today. The creation of human tissue samples frozen sections are extremely difficult situation to get very immature permanent tooth. Samples were obtained for some future plans in situ hybridization is performed to confirm the expression and immunostaining.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学・抗菌ペプチド

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯を歯槽骨内に支持するだけでなく、歯周組織の再生に関与していることが代表的な歯周外科治療の一つである組織再生誘導法の開発の過程で明らかとなってきた。したがって、歯根膜の増殖や分化のメカニズムを探ることは、歯周治療すなわち歯の延命に非常に重要であると思われる。これまでに、免疫応答に関与する FDC-SP が、歯根膜組織に特異的に発現していることが明らかにされた。しかし、ヒト歯根膜での局在およびその機能的役割については不明である。したがって、歯周病の発症と進行が宿主の局所免疫応答の違いに関与している可能性があるということから考えると、歯周組織での FDC-SP 発現を調べることは、非常に意義深いと考えられるため今回の研究課題を着想した。

2. 研究の目的

(1) 歯根膜は歯を歯槽骨内に支持するだけでなく、歯周組織の再生に関与していることが代表的な歯周外科治療の一つである組織再生誘導法の開発の過程で明らかとなってきた。したがって、歯根膜の増殖や分化のメカニズムを探ることは、歯周治療すなわち歯の延命に非常に重要であると思われ、国内外の研究チームにより様々な手法で歯根膜に特異な遺伝子やタンパクの発現を解析されてきた。Nakamura らはヒトの歯根膜組織と、その歯根膜を *in vitro* で培養することにより脱分化させた線維芽細胞で発現している遺伝子群をサブトラクション法により比較したところ、免疫応答に関与する FDC-SP 遺伝子が、歯根膜組織に特異的に発現していることを明らかにした。しかし、ヒト歯根膜での FDC-SP 遺伝子発現や、タンパクレベルでの FDC-SP の局在およびその機能的役割については不明である。したがって、歯周病の発症と進行が宿主の局所免疫応答の違いに関与している可能性があるということから考えると、歯周組織での FDC-SP 発現を調べることは、非常に意義深いと考えられる。研究代表者はこれまでに、歯周組織に発現している新規細胞外マトリックスについて解析を行っており、一通りの分子生物学的実験手技を会得している。また、倫理的な側面に配慮した研究計画の立案できることから今回の研究課題を着想するに至った。

(2) FDC-SP と歯周組織の関連について、
①ヒト歯根膜組織に FDC-SP 遺伝子が特異

的に発現していた。②マウスにおいて腸管、胃、前立腺および甲状腺には FDC-SP 遺伝子の発現が認められなかったものの、唾液腺である耳下腺において FDC-SP 遺伝子の発現が認められた。③マウスの歯および歯周組織での FDC-SP mRNA の局在を *in site* ハイブリダイゼーションにより調べたところ、歯根膜に FDC-SP mRNA の発現が観察されたことが明らかとなっている。しかし、以下の点については未だ明らかとなっていない。

①ヒト歯根膜（歯周組織）にタンパクレベルで FDC-SP が存在しているかどうか。

②ヒトにおいて FDC-SP はマウスと同様に線維芽細胞が産生しているかどうか。

③FDC-SP は構造的にスタセリン類似しているが、タンパクレベルでの発現量や組織での局在においても類似性は見いだせるか。

④歯根膜以外の歯周組織にも FDC-SP が存在しているかどうか。

⑤歯根膜における FDC-SP の機能的役割は何か。

したがって今回の研究期間内に以下の点について実験を計画し、遂行する。

・①、③の疑問点に対し、歯周病患者と歯周組織健全者から歯肉溝浸出液 (GCF) または歯周組織を採取し、GCF 中またはホモジナイズサンプル中の FDC-SP 量を両群間で比較し、病態または重症度との相関を検討する。

・②、④の疑問点に対し、歯周病患者と歯周組織健全者から歯周組織を採取し、免疫染色や *in site* ハイブリダイゼーションにより FDC-SP の局在を組織学的に観察する。

・⑤の疑問点に対し、歯根膜細胞や株化細胞、歯周病関連細菌株を用い、FDC-SP の歯周組織での機能的役割を解析する。

(3) 抗菌ペプチドとして知られているスタセリンと FDC-SP は構造が類似し、マウス耳下腺に局在が見いだされた FDC-SP が、スタセリンと同様に歯と歯周組織が付着し、その破壊をもって歯周炎の発症とされている歯肉溝や歯根膜で抗菌性に関与しているとすると、歯周組織再生医療における歯根膜の特異性を検出するためのマーカーとしてだけでなく、歯周病の発症や進行を判断するためのマーカーになり得る可能性を有しているのではないかと考えられる。また予備実験ではあるが、炎症性歯周組織（歯肉と歯根膜）において強い FDC-SP とスタセリンの mRNA 発現を確認できたことから、(2) - ②は明らかにできると思われる。（予備実験に使用した歯周組織サンプルは他の医学研究に対し、試料の使用に対する同意を得られている歯周病患者のサンプルを使用した。）
FDC-SP とスタセリン mRNA の発現強度か

ら推測すれば、(2) - ①である GCF やホモジナイズサンプル中の FDC-SP とスタセリンをタンパク量として検出でき、病態や重症度といった臨床症状との相関について解析することができると考えている。

(2) - ③については FDC-SP の抗菌性について歯周病原性細菌株を用いて *in vitro* の実験系で検討し、歯肉上皮細胞や線維芽細胞に対する影響を、サイトカインの mRNA とタンパク質発現により検討できると考えている。以上のことから、今回の研究課題を遂行することによって得られる結果は、今後の歯周治療の発展ならびに医療費削減につながり国民の健康に関与すると思われる。

3. 研究の方法

(1) GCF と組織サンプルの採取に関して

本申請課題のサンプルの取り扱いに関して19年度中に愛知学院大学歯学部ヒト細胞組織遺伝子疫学情報倫理委員会にて審査、承認を受けた後、本学歯周病科通院患者に対し、研究内容を十分説明し、文書にて同意の得られた被験者より採取する。GCF 採取は通常の歯周組織検査と同程度の手技であり特に危険・不利益を生じるとは考えられない。組織サンプルの採取は治療上必要となる抜歯、歯周外科処置およびスケーリング・ルートプレーニング処置を行うときに同時に行うため不利益を生じるとは考えられない。研究を行うに当たり GCF サンプルは10被験者より20サンプル、組織サンプルは10被験者より10サンプルを計画している。

(2) RT-PCR に関して

GCF 中のタンパク質発現を ELISA にて測定するにあたり、歯肉での mRNA 発現が必須であると思われる。したがって、組織サンプルから各々 mRNA の抽出を行い、FDC-SP、スタセリンの mRNA 発現を観察する。

(3) ELISA に関して

吸湿採取法にて GCF を採取し、採取した GCF は competitive ELISA 法にて FDC-SP、スタセリン量を測定する。検出感度が低く測定できないときは一次抗体の精製を試みる。ただし、目的タンパク質の定量が、ELISA にて検出感度が低すぎ測定できないと予想される場合、Dot blot 解析または定量的 PCR にて代用することも考慮している。

(4) 免疫染色, *in situ* ハイブリダイゼーションに関して

歯を含む組織サンプルの免疫染色には粘着フィルム法 (川本法) により未固定非脱灰凍結切片を作製し、ダコ社製 ENVISION/HRP(DAB) システムにて染色観察を行う。In site ハイブリダイゼーションはホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、ダコ社製 GenPoint System Kit (ビオチン) にて染色観察を行う。

(5) 細菌・細胞を用いての FDC-SP、スタセリンの機能解析に関して

スタセリンに関しては、にて口腔細菌の発育阻止濃度を検討する研究が行われており、歯周病関連細菌である A.

actinomycetemcomitans や *P. gingivalis* を用いて FDC-SP に関しても検討し、スタセリンと同様の効果があるかどうか調べる。また細菌の歯または歯周組織構成細胞への付着に対する FDC-SP とスタセリン影響を調べる。FDC-SP はマウス B 細胞の走化性を誘導し、遊走能を増強することが知られているが、ヒト歯根膜や歯肉結合組織を構成する線維芽細胞 (HGF) に対する影響は不明である。HGF を FDC-SP とスタセリン刺激により産生されるサイトカイン等を検討する。

4. 研究成果

(1) GCF サンプルからスタセリン発現を確認することが困難であり、研究の遂行が思うように進まないという結果となってしまった。現在でも GCF サンプルからの発現は確認できていない。

(2) 抗体の生成も試みたが精度の高い抗体作成ができなかった。現在も精度の高い抗体作成を行っているところである。

(3) ヒト組織サンプル凍結切片作成に関しては幼弱永久歯を得ることが非常に困難を極めている状況である。いくつかサンプルを得ることができたため、今後 *in situ* hybridization および免疫染色を行っていく予定である。

(4) スタセリンに関しては、これまでに口腔細菌の発育阻止濃度を検討する研究が行われており、歯周病関連細菌である A. *actinomycetemcomitans* や *P. gingivalis* を用いて FDC-SP に関しても検討し、スタセリンと同様の効果があるかどうか調べていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 隆政 (YOKOI TAKAMASA)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：40469010

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：