

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21038

研究課題名（和文）マルチスケールで迫る歯肉上皮バリア機構の脆弱性の探索

研究課題名（英文）Exploring the fragility of the gingival epithelial barrier mechanism

研究代表者

中村 恵理子（Nakamura, Eriko）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00755069

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、早期に歯周炎を発症するKindler症候群の責任遺伝子であるFERMT1に着目し、歯周組織におけるFERMT1の生体的役割を検討することにより、上皮バリアの分子基盤の一端を明らかにすることを旨とした。免疫組織化学により、FERMT1はヒト歯肉上皮に発現していたため、FERMT1ノックダウン歯肉上皮細胞を作製し、その形態学的解析を行ったところ、FERMT1が歯肉上皮構造を維持するために重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、分子生物学的検討を行ったところ、FERMT1は歯肉上皮構造維持に必須の接着因子と関連して歯肉上皮バリアの恒常性の維持に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病の発症は、感染から歯周組織を守る上皮バリアが決壊し、上皮細胞の脱落により歯周ポケット内に潰瘍が形成されることにより始まる。歯周病の発症および進行に、宿主因子である上皮バリアの破綻が大きく関与しているものの、上皮バリアの恒常性を担う分子については未だ不明な点が多い。感染因子だけでなく、宿主因子の観点から歯周病の発症機構を捉えていくことは、歯周病発症メカニズムの統合的理解を前進させ、究極的には、防戦一方だった対処療法の歯周病治療を、歯周病の発症前に宿主因子に働きかけていくことのできる強力な治療法へと繋げていく礎となる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on FERMT1, the gene responsible for the early onset of periodontitis in Kindler's syndrome, and aimed to clarify part of the molecular basis of the epithelial barrier by investigating the biological role of FERMT1 in periodontal tissue. Immunohistochemistry revealed that FERMT1 was expressed in human gingival epithelium. We generated FERMT1 knockdown gingival epithelial cells and performed morphological studies, and revealed that FERMT1 plays an important role in maintaining the gingival epithelial structure. Furthermore, molecular biological examination suggested that FERMT1 is involved in the homeostasis of the gingival epithelial barrier in association with adhesion factors that are essential for the maintenance of gingival epithelial structure.

研究分野：予防歯科学

キーワード：歯周病 歯肉上皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病の発症は、感染から歯周組織を守る上皮バリアが決壊し、上皮細胞の脱落により歯周ポケット内に潰瘍が形成されることにより始まる。この潰瘍面から供給される血液を得て、歯周病原性菌がバイオフィーム内で増加し、ディスバイオーシスと呼ばれる状態となった高病原性化バイオフィームが宿主の防御力を凌駕し歯周病が進行していく。このように歯周病の発症および進行に、上皮バリアの破綻が大きく関与しているものの、上皮バリアの恒常性を担う分子については未だ不明な点が多い。

歯周組織の上皮バリア恒常性に関わる分子基盤を探るモデルとして、歯周炎を随伴する症候群が挙げられる。Kindler 症候群は、歯周炎を随伴する症候群の一つであり、脆弱な剥離性歯肉および歯肉の自然出血を認め、10代前半から早期歯周炎を発症することが知られている。近年、この Kindler 症候群の責任遺伝子が *FERMT1* (fermitin family member-1) であることが報告されたが、*FERMT1* の歯肉上皮における生物学的検討を行った研究は見受けられない。そこで本研究では、歯肉上皮における *FERMT1* の機能的役割を分子、細胞、組織レベルで重層的に検討することにより、上皮バリアの崩壊の側面から歯周病発症・進行のメカニズムの一端を明らかにすることを旨とし、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、形態学的、組織学的、分子生物学的手法を用いて、*FERMT1* の歯肉上皮バリア機構における役割を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯周組織における *FERMT1* 発現の検討

採取した健常(非歯周病)ヒト歯周組織は、4%パラホルムアルデヒドに、4℃にて一晩浸漬固定した。固定したサンプルをパラフィン包埋し、パラフィンブロックとして4℃にて保管した。パラフィンブロックを薄切して作製した切片を、ヘマトキシリン・エオジン染色および抗*FERMT1*抗体を用いて免疫組織化学を行なった。ヘマトキシリン・エオジン染色は光学顕微鏡にて、免疫組織化学染色は共焦点顕微鏡にて観察した。なお、ヒト歯肉サンプルについての臨床研究は、大阪大学大学院歯学研究科、歯学部附属病院の倫理審査委員会の承認を得ている。

(2) *FERMT1* 遺伝子改変歯肉上皮細胞の作製および形態学的観察

不死化ヒト歯肉上皮細胞 (epi4; Murakami et al., 2002, Journal of Dental Research) を用い、短鎖干渉 RNA (siRNA) を介して *FERMT1* 遺伝子をノックダウンし、*FERMT1* ノックダウン歯肉上皮細胞を作製した。*FERMT1* ノックダウン歯肉上皮細胞と対照群細胞の表現型について位相差顕微鏡にて形態学的解析を行った。

(3) *FERMT1* の機能解析

FERMT1 遺伝子改変歯肉上皮細胞と対照群を設定し、*FERMT1* タンパクの標的候補となりうる接着因子、接着因子レセプターのタンパク発現量の増減をウェスタンブロット法を用いて検討した。*FERMT1* タンパクと標的候補タンパクの蛍光免疫染色を行い、細胞内局在を共焦点顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯周組織における *FERMT1* 発現の検討

ヒト歯周組織における *FERMT1* タンパクの発現を免疫組織科学にて検討した。その結果、歯

肉内縁上皮および歯肉外縁上皮の角化細胞層、顆粒細胞層、有棘細胞層、基底細胞層の細胞質に FERMT1 タンパクの発現を認めた（図 1.）。歯肉結合組織において FERMT1 タンパクの発現は認めなかった。以上の結果より、FERMT1 は歯肉上皮組織においてなんらかの生体的役割を有している可能性が推察された。

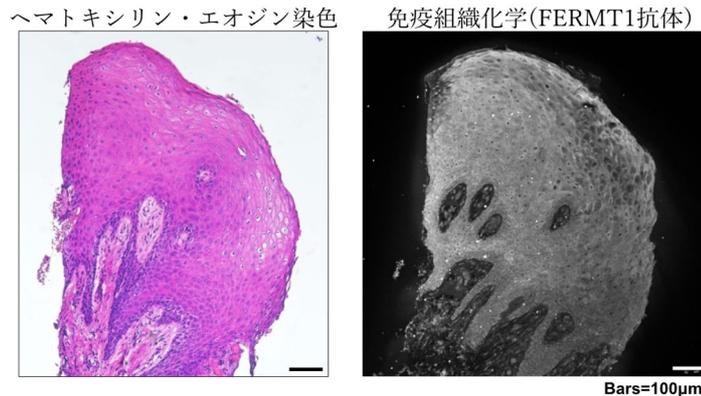


図1. FERMT1タンパクはヒト歯肉上皮に発現する

（ 2 ） FERMT1 遺伝子改変歯肉上皮細胞の作製および形態学的観察

FERMT1 の歯肉上皮細胞における生体的役割を検討するために、*FERMT1* ノックダウン歯肉上皮細胞を作製し、表現型を検討することとした。*FERMT1* ノックダウン歯肉上皮細胞と対照群において形態学的観察を行なったところ、*FERMT1* ノックダウン歯肉上皮細胞は、対照群と比較し、紡錘状の細胞形態を示した。また、クラスター形成を比較したところ、対照群ではシート状を呈するが、*FERMT1* ノックダウン歯肉上皮細胞においては、シート状ではなく篩状のクラスター形成を認めた（図 2.）これらの結果より、FERMT1 は、歯肉上皮における細胞形態ならびに歯肉上皮構造を維持するために重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

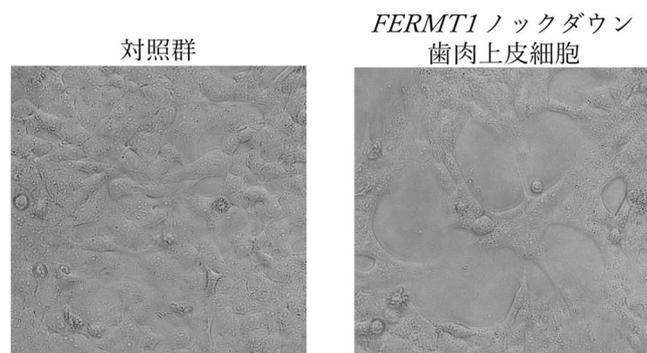


図2. *FERMT1*ノックダウン歯肉上皮細胞は対照群と異なるクラスター形成を呈する

（ 3 ） FERMT1 の機能解析

歯肉上皮における細胞形態ならびに歯肉上皮構造を維持するためには、接着因子、接着因子レセプターが必須的役割を担っていることが明らかにされている。従って、FERMT1 は、接着因子、接着因子レセプターと関連して、上皮構造を維持している可能性が考えられた。その可能性を検討するために、*FERMT1* ノックダウン歯肉上皮細胞と対照群において標的候補因子のタンパク発現量をウェスタンブロットにて、細胞内局在を蛍光免疫染色にて検討したところ、*FERMT1* ノックダウン歯肉上皮細胞において細胞内局在におけるタンパク発現量が減少する因子を同定した。

本研究より、FERMT1 は、歯肉上皮構造に必須の接着因子と関連して、上皮バリアの恒常性の維持に関与していることを見出した。現在、*FERMT1* 変異体を作成し、標的因子との結合領域の解析を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeuchi Hiroki, Nakamura Eriko, Yamaga Shunsuke, Amano Atsuo	4. 巻 3
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Infection Induces Lipopolysaccharide and Peptidoglycan Penetration Through Gingival Epithelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oral Health	6. 最初と最後の頁 845002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/froh.2022.845002	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷垣慶太、加藤祐太、中村恵理子、山賀俊介、竹内洋輝、天野敦雄
2. 発表標題 糖尿病1b型の責任遺伝子 SLC37A4 が歯肉上皮細胞のタイトジャンクション関連タンパクに及ぼす影響
3. 学会等名 第33回近畿・中国・四国口腔衛生学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 祐太、谷垣慶太、中村恵理子、山賀俊介、竹内洋輝、天野敦雄
2. 発表標題 バイオアクティブ素材S-PRG フィラーの歯肉上皮細胞バリア機能への影響
3. 学会等名 第33回近畿・中国・四国口腔衛生学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山賀俊介、谷垣慶太、中村恵理子、竹内洋輝、天野敦雄
2. 発表標題 タバコ抽出液が歯肉上皮細胞のバリア機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第134回大阪大学歯学会例会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------