

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890128

研究課題名（和文）Smad2の歯肉上皮ダウングロース抑制による歯周組織再生療法の改善に関する研究

研究課題名（英文）Investigation of the enhancement of periodontal regeneration by inhibition of gingival downgrowth by Smad2 overexpression

研究代表者

富川 和哉（TOMIKAWA KAZUYA）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60614922

研究成果の概要（和文）：

歯肉上皮のダウングロース抑制を実現するために、機械的な方法でマウスの歯槽骨に欠損を行った。当初より臨床に近い状況を考え、最終的には歯周病原細菌の感染による骨欠損を作製するように変更して、明らかな骨欠損をCT画像で確認できた。また、TGでは、WTと比較して結合組織の治癒を促進することを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

We made alveolar bone defect in mouse by the mechanical way to inhibit gingival downgrowth. But we modified the way to suit clinical situation. Finally, the mouse model was established by infection of periodontopathic bacteria, we could confirm a clear alveolar bone defect by CT scan. Additionally our findings indicated that healing of periodontal connective tissue was promoted in TG as compared with WT.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：歯学、再生医学、細胞・組織、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

歯周組織は、歯肉上皮、歯根膜、歯槽骨、セメント質といった外胚葉系と間葉系の組織から構成される特異的な部位である。従来の歯周療法を行った場合は、ターンオーバーの早い歯肉上皮細胞が、骨芽細胞などの間葉

系細胞が増殖する前にダウングロースしてしまうことが知られている。この長い上皮性付着は、細菌感染に対して脆弱であり、歯周病の再発が問題となる場合が多い。

一方、近年の歯周組織再生療法の研究は、間葉系細胞の増殖を目的としたサイトカイ

ン療法が主であり、歯肉上皮の増殖制御を目的とした研究報告は殆ど無い。かつて歯肉上皮の増殖抑制を目的にGTR法が注目を浴びたが、技術依存度が高く日常の歯科診療で応用するには煩雑であり、2007年の保険導入以降も殆ど用いられていないのが実状であり、主流であったバリア膜のメーカーの市場撤退も起こっている。今後は、より簡便な方法による歯肉上皮のダウングロース抑制とサイトカイン療法とを組み合わせることによって、より確実に歯周組織再生を達成することができると考えられる。

2. 研究の目的

歯肉上皮の分子生物学的な増殖制御を行うために、我々はKeratin 14 (K14) プロモーターによってSmad2遺伝子を上皮細胞特異的に強制発現する遺伝子改変マウス (K14-Smad2 transgenic mice : TG) に着目した。我々のこれまでの研究成果で、TGの口蓋歯肉における創傷治癒過程では、Keratin 16の発現低下とともに上皮細胞の遊走能が低下しており、さらに、TGの歯肉接合上皮において、リン酸化Smad2のタンパク質がWTに比較して多く産生されているという知見を得た。今後は、歯周組織の治癒過程において歯槽骨欠損部のリモデリングが起こる際に、歯肉内縁上皮のダウングロースが実際に抑制されるのか、さらにSmad2がどのような働きをするのかを明らかにする必要がある。

そこで本申請研究の目的は、マウス歯周組織創傷治癒モデルを作製して、その骨欠損内にダウングロースする歯肉の治癒過程において、Smad2が上皮細胞の増殖能や遊走能に加えて、接着能や分化能などの包括的な細胞動態をどのように制御するのかを、発現している遺伝子の網羅的解析によって明らかに

することである。

また、創傷治癒下において、TGF- β はSmadシグナルを介することで外胚葉系組織には細胞増殖を抑制して、間葉系組織には細胞増殖を促進させる働きがあり、この上皮・間葉相互作用の歯周組織再生療法への応用は非常に有用である。よって、Smad2過剰発現によるオートクラインの結果、細胞分子生物学的に発現増加したTGF- β が歯肉結合組織の創傷治癒に与える影響を調べた。

3. 研究の方法

マウス歯周組織創傷治癒モデルの作製

① ラウンドバーを用いた骨欠損の作製

歯周組織再生療法を行うことが想定にあるため、マウスの歯周組織に外科的侵襲を加え炎症を惹起させた状態でのSmad2の働きを調べることにした。骨欠損の作製には、野生型マウス (WT) とTGの口蓋歯肉を歯肉溝切開により大きく剥離し、歯の周囲に極めて小さいサイズのラウンドバーを用いて機械的に骨欠損を作製する。剥離した歯肉は既報にあるよう5分間の機械的な圧迫により血漿循環を促す。その後、経時的に時間帯 (1, 2, 3, 5, 7 day) を割り振って、剥離した範囲内 (炎症を惹起させた範囲内) を含めて上顎骨を回収する。実験的に作製した骨欠損内の根面上の上皮のダウングロースの程度はHE染色で確認する。

② *Porphyromonas gingivalis* (Pg) の感染による骨欠損の作製

- A) 全身麻酔下でWTとTG (各10週齢) の第二大臼歯に6-0絹糸を結紮する。
- B) 37°Cで嫌気培養して、OD値を0.6から0.8に調整したPgを結紮した絹糸に浸透させる。
- C) 1週間後に第二大臼歯に結紮した絹糸に上記条件のPgを0.1ml追加浸透させ

る。

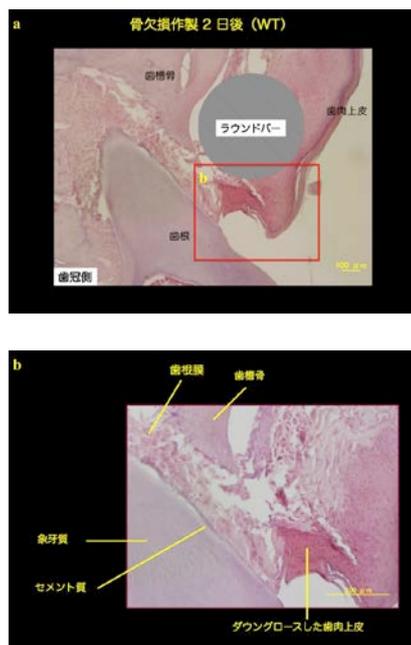
- D) 2週間後に過剰量の吸入麻酔薬を使用してマウスを安楽死させ、上顎骨を採取して、通法に従って組織の処理を行うとともに、骨欠損の状態をCT画像で確認をする。

口蓋粘膜の創傷治癒における結合組織の治癒の比較

- A) 全身麻酔下で、第一大臼歯近傍の口蓋粘膜に生検トレパンを用いて、直径 1 mm の骨膜に達する開放創を作製する。
- B) 目視観察時に上皮が創傷前の形態に回復する創傷後 7 日目まで観察して、通法に従い 5 μ m の切片を作製する。
- C) Sirius Red/Fast Green Collagen Staining Kit (Chondrex, Inc., Redmond, WA)を用いて結合組織を染色して、その量を WT と TG で統計学的に評価する。

4. 研究成果

- (1) 研究方法で記載した①のラウンドバーを用いた骨欠損の作製を行って骨欠損作製部位の H-E 染色を行った。骨欠損は作製できており、その部分に歯肉上皮のダウングロースが起こっていた。



【図 1】

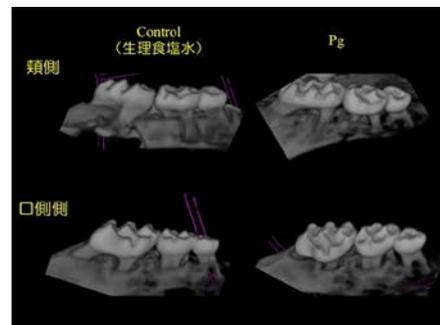
WTにおける骨欠損作製後2日目のH-E染色像を示す (bはaに示した赤枠の拡大像)。

しかし、ラウンドバーによって作製する骨欠損には以下のような問題点があった。

- 骨欠損を機械的に作製するため、その位置および大きさを同一にするのが困難であったため、正確な実験結果を得ることが難しい。
- 機械的な方法で作製された骨欠損は、歯周病原細菌の感染による骨欠損と比較して、その治癒過程において異なる性質を持つ可能性が高い。

よって、我々は歯周病原細菌の感染によって生じた骨欠損を用いることを考えた。感染させる細菌は、慢性歯周炎患者の口腔内から高頻度で検出される Pg を用いた。また、プラークを停滞させる増悪因子および Pg の足場として、当該歯の周囲に絹糸を結紮させた。また、H-E 染色を行う前に骨欠損状態の確認はCT画像で行った。

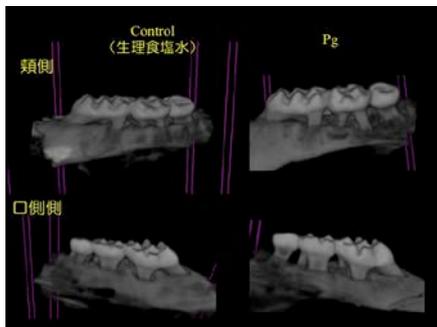
- (2-1) 実験開始後1週間では、生理食塩水を添加した WT と Pg を添加した WT に骨吸収はなかった。



【図 2-1】

WTにおける経過1週間のCT画像

(2-2) 実験開始後 2 週間では、生理食塩水を添加した WT と比較して、Pg を添加した WT において著明な骨吸収があった。

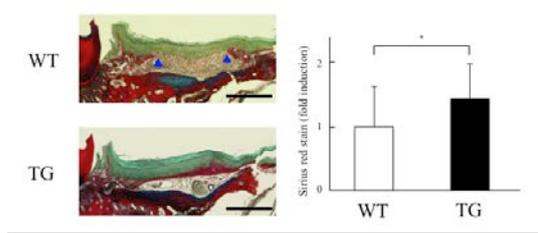


【図 2-2】

WT における経過 2 週間の CT 画像

以上の結果から、我々は Pg 添加と絹糸結紮によって実験的骨吸収モデルを確立した。現在は、生じた骨吸収が歯周病原細菌の感染によるものかを確認するために、血清 IgG 解析および組織学的解析を進めている。今後、このモデルを用いることによって、骨欠損内への歯肉上皮のダウングロース抑制のための分子生物学的・組織学的解析が再現性を持って容易に行えると考える。

(3) 口蓋粘膜の創傷後 7 日目では、WT と TG



の上皮組織の再上皮化は完了したが、WT と比較して TG では角化層と基底膜の治癒が遅かったが、結合組織の染色された量は有意に多かった。すなわち、TGF- β /Smad2 は、歯肉上皮の増殖と遊走を抑制し、さらに結合組織の治癒を促進するという、歯周組織再生にとって理想的なサイトカインである可能性

を示した。

【図 3】

口蓋粘膜の創傷後 7 日目の WT と TG の結合組織の染色像の比較

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 本郷昌一, 山城圭介, 山本直史, 下江正幸, 富川和哉, 鶴川祐樹, 高知信介, 塩見信行, 前田博史, 高柴正悟: 歯肉上皮細胞において外因性 Smad2 は細胞接着分子の発現を促進する, 第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会, 2011 年 9 月 14 日, 下関
- ② 富川和哉, 山本直史, 下江正幸, 塩見信行, 峯柴淳二, 山口知子, 本郷昌一, 前田博史, 高柴正悟: Smad2 による歯肉創傷治癒の再上皮化抑制, 53 巻日本歯周病学会会誌春季特別号, p16, 2011 年.

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① Shimoe M, Yamamoto T, Shiomi N, Tomikawa K, Hongo S, Yamashiro K, Yamaguchi T, Maeda H, Takashiba S. Overexpression of Smad2 Inhibits Proliferation of Gingival Epithelial Cells. *J Periodontal Res.* 2013. in press
- ② Tomikawa K, Yamamoto T, Shiomi N, Shimoe M, Hongo S, Yamashiro K, Yamaguchi T, Maeda H, and Takashiba S.: Smad2 Decelerates Re-epithelialization during Gingival Wound Healing. *J Dent Res.* 2012;91(8):764-70. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富川 和哉 (TOMIKAWA KAZUYA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 60614922