

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462797

研究課題名(和文) 歯肉付着上皮の歯面側最表層細胞による上皮性付着の維持機構について

研究課題名(英文) Epithelial attachment of the most superficial layer in junctional epithelium.

研究代表者

橋本 貞充 (HASHIMOTO, Sadamitsu)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10201708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)： 辺縁性歯周炎では、口腔粘膜とエナメル質を接合する付着上皮のバリアの破壊により細菌性毒素が侵入して炎症が起こり、組織が破壊される。歯周組織破壊と修復メカニズムの解明には、エナメル質と面する付着上皮の最表層細胞(DAT細胞)がそのキーになると考え、付着上皮の防御機構と再生のメカニズムを解明することを目的として研究を行った。

付着上皮細胞やDAT細胞にはタイト結合蛋白やアクアグリセロポリンが発現し、上皮細胞間隙のランゲルハンス細胞や末梢神経終末と共に防御機構を構成していることを示唆するデータを得ると共に、歯肉溝滲出液の生成には付着上皮下の毛細血管網の血流量が直接的に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The junctional epithelium (JE) is located at the dento-epithelial area between the cervical enamel surface facing the cemento-enamel junction at the gingival sulcus. The marginal periodontitis evoked by a loss of the barrier function due to the destroying the JE by bacterial infection and inflammatory change. The most superficial layer faced to the enamel in the JE have been termed as DAT cells (the cells directly attached to the tooth.), and DAT cells possess important role in tissue dynamics and in the reparative capacity of the JE. Immunohistochemically, DAT cells are positive for tight junction protein (occludin, claudin family) and aquaglyceroporins, and associated with the network of Langerhans cell and peripheral nerve fiber at the intercellular space of JE keratinocyte. Furthermore, production of gingival crevicular fluid may correlated with blood circulation volume of micro capillary vessel beneath the JE.

研究分野：口腔病理学

キーワード：付着上皮 上皮性付着 歯周組織 歯肉溝滲出液 DAT細胞

### 1. 研究開始当初の背景

歯周組織は角化重層扁平上皮からなる口腔粘膜に被覆・保護されているが、歯周組織防御の最も重要な点は、口腔上皮と連続した歯肉付着上皮(接合上皮)が、歯頸部のエナメル質表面と強固な接着機構をつくりあげ、デンタルバイオフィルムに代表される外部環境からの様々な侵襲から、歯周組織の内部環境を守ることにある。この付着上皮はヒトにおいては、セメント-エナメル境を先端とし、歯冠側の1mm程度の部分で帯状となって歯頸部の全周を取り巻いており、歯面側とは内側基底板を、歯肉結合組織側とは外側基底板を介して、エナメル質と歯肉結合組織とを強固に結合させている。

このような付着上皮について我々は、エナメル側の最表層にある DAT 細胞 (cells directly attached to the tooth) あるいは TF 細胞 (tooth-facing cells of JE) とよばれる特殊な付着上皮細胞が laminin 2 を分泌して内側基底板を構成し、付着面の細胞表面に発現する integrin 6 4 により、エナメル質表面に強く接着してすると共に、integrin 3 を伸展側に発現して歯冠側へと移動する (Kinumatsu T. et al., Tsuchiya Y. et al. J.Periodont.Res., 2009) こと、歯肉切除後の再生過程や、歯周炎後の露出歯根面に形成される長い付着上皮においても laminin 2、integrin 4、integrin 3 が、炎症消退後の治癒過程において、エナメル側の内側基底板に限局して強く発現しており、付着上皮細胞の細胞接着と移動からなるターンオーバー機構に重要な役割を果たしていること (Masaoka T. et al. J.Periodont.Res., 2009, Sugisawa M. et al. J.Periodont.Res., 2010) さらには、このような DAT 細胞は、常に細胞増殖マーカーによって標識され、高い分裂増殖のを維持しながら、接着面では不規則な多数の細胞突起を持って内側基底板と半接着斑を介して接着と細胞移動の機能を担っていることなどを明らかにしてきた。(Kinumatsu, T. et al. J.Periodont.Res., 2009, Ishikawa, H. et al. J.Periodont.Res., 2005)

従来、歯肉炎や辺縁性歯周炎の初期においては、付着上皮が破壊されて口腔粘膜とエナメル間の上皮性付着によるバリア機構が消失することにより、外界からの細菌性毒素や起炎性物質の歯周組織内への侵入を許し、防御反応としての炎症が惹起されて組織が破壊されると考えられてきた。付着上皮破壊の初期病変は、付着上皮とエナメル質との接着面である内側基底の部分で起きるのではなく、エナメル側より 2~3 層の付着上皮の細胞間結合が切れてスリットが形成されることにより始まるといわれているが、このことは、我々が報告してきた DAT 細胞によるエナメル質やセメント質表面への上皮性付着による結合が強固なものであるとの主張を支

持していると思われる。

エナメル質表面や露出歯根面に付着する DAT 細胞は、外力による付着上皮の破壊や炎症にともなう侵襲に対して、歯面との接着を維持し、細胞の分裂増殖と遊走により、上皮性付着を速やかに回復させる重要な役割を担っていると考えられるが、LPS や外力によって破壊された付着上皮が、結合組織側の基底細胞によって再生するのか、それとも、エナメル側の DAT 細胞の分裂増殖によって機能を回復するのか、については明らかとなっていない。また、辺縁性歯周炎の引き金となる付着上皮細胞間の断裂についても、通常の付着上皮においても好中球の遊走が多く見られることから、自然免疫に関連して起こる自然炎症が関わっていると考えられるが、歯肉上皮および付着上皮のケラチノサイト細胞間隙に存在する抗原提示細胞のランゲルハンス細胞の働きについても検討をする必要があると考えられた。

### 2. 研究の目的

歯周組織破壊の引き金となる付着上皮のバリア機構の破綻と、付着上皮の修復および再構築のメカニズムの解明には、エナメル質と接着する付着上皮の最表層細胞(DAT細胞)がそのキーになると考えられることから、本研究では、歯周組織の健康維持の鍵となる付着上皮の防御機構を再検討し、付着上皮破壊と再生のメカニズムを解明することを目的として当初の計画を立案した。具体的には、(1) 歯肉付着上皮のエナメル側最表層細胞(DAT細胞)の構造と歯面への接着・移動と分裂・増殖の機能、(2) 付着上皮内の Langerhans 細胞の局在と神経終末の分布、(3) 歯肉の防御を担う歯肉溝滲出液の生成と微小循環について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 組織学的および免疫染色については、ラットをソムノペンチル腹腔内麻酔下で灌流固定後、上顎骨および下顎骨を摘出し、非脱灰および 10%EDTA による脱灰後、歯肉部顎骨を切り出し、凍結切片およびマイクロスライサーによる 100 $\mu$ m の組織薄片を作製し、免疫蛍光染色をおこなった。(2) 付着上皮細胞の立体的な組織構造観察のためには、ディープエッチング・フリーズフラクチャーレプリカ観察および、オスミウム浸軟(Osmium maceration)法による透過電顕および走査電顕観察をおこなった。(3) 歯肉の微小循環の観察については、連携研究者として関わっている共同研究の「灌流顎下腺におけるタイト結合近傍の細胞膜振動と傍細胞輸送の関係」(生理学研究所・村上政隆准教授・科研費基盤 C: 26460308) の手法を用い、灌流顎下腺と同様の手法で、Lucifer Yellow および Sulfo-Rhodamin B と共に、血管内皮に特異的な蛍光標識 Tomato レクチンを大動脈灌流お

よび鼠径部の静脈より注入して標識し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

#### 4. 研究成果

歯肉付着上皮の maceration 標本の電顕観察では、付着上皮の拡張した細胞間隙には、好中球などの白血球と思われる平滑な表面を持つ細胞と、樹枝状の細胞突起を持つ細胞が観察されると共に、ケラチノサイトの細胞間の細胞表面に、末梢神経終末と思われる細線維が観察される。接着界面の解明のために、エナメル質表面の DAT 細胞の接合面の急速凍結レプリカ観察を試みたが、歯肉組織における付着上皮の形態的な問題、あるいは上皮下の膠原線維の豊富さなどの問題から、接着界面についての十分なデータを得るまでには至らなかった。免疫蛍光染色では、口腔粘膜上皮では、aquaglyceroporin の 3 および 9 が有棘層上部の細胞表面に発現しており、Tight junction 構成タンパクの Occludin、Claudin-1 および Claudin-4 が、口腔上皮の有棘層上部から顆粒層で細胞膜上皮発現し、上皮の水平断では網目状の構造を示し、付着上皮では基底側上部から先端部、特に DAT 細胞の付着上皮表層で強く細胞質全体に発現するのが観察される。このような付着上皮においても Langerin 抗体に陽性を示すランゲルハンス細胞が認められ、活発な抗原との接触と抗原提示が伺われる。また、付着上皮先端部では、エナメル側の内側基板は先端部まで形成されているにもかかわらず、結合組織側の外側基板は先端部までは形成されていないことから、付着上皮先端部の位置は固定されているものではなく、さらに、付着上皮先端からわずかに歯冠側の結合組織側で、歯根膜内で網状の構造を形成して歯根を包み込んでいる Malassez 上皮遺残と連続する可能性があることをいくつかのデータから考えており、この点に関しても検証を進めている。

これらのことから、歯肉においては、外界からの種々の刺激を上皮性の付着によって遮断する付着上皮のケラチノサイト、特に接着を担う DAT 細胞が、末梢神経線維あるいはランゲルハンス細胞との連携の中で、エナメル側の DAT 細胞の高い分裂増殖能や接着能、遊走能により、歯周組織の生体防御の機構を維持している可能性が考えられ、今後のさらなる検討が必要であると考えられた。

歯肉溝滲出液については、連携研究者の生理学研究所の村上政隆准教授らと共に、ラット顎下腺の人工灌流系を用い、唾液腺腺房における傍細胞輸送経路について、各種蛍光トレーサーやトマトレクチンを用いた血管描出法による毛細血管網の立体構築のイメージングを行っており、同様の手法で、トレーサーをラットの大動脈灌流および鼠径部の静脈より注入して標識することで、ラット歯肉の毛細血管網の構築を試みている。歯肉溝滲出液は付着上皮直下の有窓性毛細血管から構成される血管床から漏出すると考えら

れるが、ラット歯肉においては、現在までのところ、付着上皮直下には、特徴的な有窓性毛細血管床を形態的に捉えることができていない。しかしながら、歯肉溝滲出液に関しては、共同研究でおこなっているラット顎下腺の人工灌流系では、腺房周囲の毛細血管の血流量の増加が、唾液分泌量と相関することを示すデータを得ていることから、歯肉においても付着上皮直下の有窓性毛細血管の血流量の増加および血管圧の増加が、歯肉溝滲出液生成の駆動力となる可能性を考えており、現在、さらなる検討を加えているところである。

#### 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3件)

##### 1. Clear Cell Variant or Clear Cell Component?

Muramatsu T, Hashimoto S, Ide Fumio.

The Bulletin of Tokyo Dental College, 57(2), 55-56, 2016

##### 2. Morphological analysis of relationship between oral cytology and biopsy in diagnoses of leukoplakia or oral lichen planus.

Matsuzaka K., Hashimoto K., Nakajima K., Horikawa T., Kokubun K., Yano H., Sakamoto M., Murakami S., Yakushiji T., Kasahara K., Katakura A., Shibahara T., Hashimoto S., Inoue T.

Journal of Japanese Society for Evidence and the Dental Professional /JJSEDP, 8 (1) 22-28, 2016

##### 3. Expression and localization of aquaglyceroporins AQP3 and AQP9 in rat oral epithelia.

Poveda, M., Hashimoto, S., Enokiya, Y., Matsuki-Fukushima, M., Sasaki, H., Sakurai, K., Shimono, M.

Bull. Tokyo Dental College, 55(1):1-10, 2014

[学会発表](計11件)

##### 1. Murakami M, Wei F, Narita T, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M (2017.3.28-30)

Paracellular fluid secretion and microcirculation in the perfused submandibular gland.

第94回日本生理学会大会(アクトシティ 浜松 静岡県).

##### 2. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M (2017.2)

Microcirculation & Paracellular Fluid

Secretion in the perfused Submandibular gland.

Gordon Research Conference on Salivary Glands and Exocrine Biology. (Hotel Galvez Galveston TX USA)

3. 橋本 貞充, 成田 貴則, 村上 政隆 (2016.12.2)

灌流ラット顎下腺の血管系の可視化とムスカリン刺激による変化

第61回日本唾液腺学会(文教学院 文京区 東京都)

4. Hashimoto S, Murakami M, Narita T, Sato M, Shibukawa Y (2016.12.1)

Visualization of microcirculation and paracellular pathway in the perfused submandibular gland.

The 4th International Symposium in honor of Niels Stensen (Okazaki Conference Hall, Okazaki, Aichi, Japan)

5. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M, Steward MC. (2016.11.29-12.1)

Microcirculation and paracellular fluid secretion in the perfused submandibular gland of the rat.

The 4th International Symposium in honor of Niels Stensen (Okazaki Conference Hall, Okazaki, Aichi, Japan)

6. 成田 貴則, 橋本 貞充, 澁川 義幸, 佐藤 正樹, 村上 政隆 (2015.12.5)

灌流ラット顎下腺の共焦点レーザー顕微鏡による3D観察:蛍光ビーズによるポンプアーチファクトの除去

第60回日本唾液腺学会(文教学院大学、文京区、東京都)

7. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M. (2015.11.22-25)

Microcirculation and paracellular fluid secretion in the perfused submandibular gland.

8th FAOPS 2015, (Bankok, Thailand)

8. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M. (2015.3.21-23)

Morphological approach for a paracellular fluid transport in salivary glands.

第92回日本生理学会大会(神戸国際会議場展示場、神戸市、兵庫県)

9. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S,

Shibukawa Y, Sato M. (2015.2.15-20)

Microcirculation and fluid secretion by Danshen stimulation in the perfused submandibular gland.

Gordon Research Conference on Salivary Glands and Exocrine Biology. (Hotel Galvez, Galveston TX, USA)

10. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M. (2014.6.25-6.28)

Morphological Search for a Paracellular Secretion Route in Salivary Glands.

92nd IADR General Session and Exhibition (iCC, Cape Town, South Africa)

11. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M. (2014.2.21)

Contribution of paracellular fluid transport to the whole fluid secretion by the salivary gland.

Kitasato Fluid Transport Symposium 2014 (北里大学薬学部、白金台、東京都)

〔図書〕(計1件)

1. 新編・口腔外科・病理診断アトラス, 監修:下野正基, 山根源之, 橋本 貞充 著分担:軟組織の炎症性疾患(炎症の概念・免疫の概要・口腔粘膜の構造と防御機構・歯周組織の構造と防御機能) pp 21~44, 唾液腺疾患(唾液腺のしくみとはたらき・) pp 373~381, 唾液腺腫瘍(唾液腺腫瘍総論・良性腫瘍・悪性腫瘍) pp 394~450, 総ページ528, 医歯薬出版, 東京, 2017/1/10

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 貞充 (HASHIMOTO Sadamitsu)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 10201708

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

村上 政隆 (MURAKAMI Masataka)

生理学研究所・細部器官研究系・准教授

研究者番号: 10104275

(4)研究協力者 なし