

令和元年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05026

研究課題名(和文)次世代歯周軟組織再生療法としての角化上皮粘膜誘導制御

研究課題名(英文) Guided control of keratinized epithelial mucosa as a next generation periodontal soft tissue regeneration

研究代表者

前川 賢治 (Maekawa, Kenji)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20304313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：角化歯肉は歯やインプラントの長期予後を確保するために重要だが、その再生治療は確立されておらず、自己組織移植による治療に依存している。実際、角化歯肉がどのようなメカニズムで形成されているか分かっていない。本研究で上皮の発生や恒常性維持に重要な基底膜に着目した解析を行った結果、角化歯肉の基底膜には、非角化歯肉と比べて、特定の成分が高発現していることが明らかとなった。さらに *in vitro* において、同定した成分の機能解析を行った結果、口腔粘膜上皮細胞の角化を亢進する作用を認め、口腔粘膜上皮の角化を制御するメカニズムの一端を突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、基底膜は口腔粘膜の角化を制御する重要な因子である可能性が示唆された。つまり、角化歯肉を誘導する基底膜を人工的に作製することで、自己組織移植を回避できる可能性、さらには角化に重要な基底膜分子の発現を亢進させる薬剤を非外科的に応用することで、生物学的に非角化歯肉部位を角化歯肉に誘導できる可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Keratinized gingiva around the tooth and dental implant is critical to maintain a healthy condition of periodontal and peri-implant tissues, however the mechanisms regulating keratinization of gingiva still remain unclear. In this study, we hypothesized that the basement membrane is a critical regulator of keratinization of the oral mucosal epithelium. From our results, we found out that the difference in keratinization of oral mucosa is associated with the composition of the basement membrane. In addition to this, the composition which highly expresses in keratinized gingiva induced human gingival epithelial cells to express keratinized marker *in vitro*.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：角化歯肉 角化歯肉獲得法 基底膜 型コラーゲン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯の長期予後を左右する重要な因子の1つに、健康な歯周組織が挙げられる。中でも、歯の周囲に存在する角化歯肉は、口腔衛生の維持や感染予防に有利な環境を提供するだけでなく、過剰なメカニカルストレスから歯周組織を守り、長期的に安定した予後をもたらすために必要であると考えられている。そのため、現在の歯科臨床においては、角化歯肉が減少・不足した場合には、口蓋粘膜などから角化組織を移植する遊離歯肉弁移植術が行われている。しかし、移植片採取部位の術後疼痛や出血が患者の大きな苦痛となるうえ、組織の壊死・感染等の合併症発生率も高く、また十分量の角化歯肉を獲得するためには、術者の技術に大きく依存する等の問題を抱えている。また、歯槽骨再生に関しては有効な人工材料を用いた再生療法も開発されてきているが、残念ながら軟組織の再生については自己組織移植に依存しない再生療法は確立されておらず、より低侵襲、簡便かつ確実な角化歯肉獲得法の開発が望まれる。

口腔内において、角化歯肉と非角化歯肉は連続した組織であるにも関わらず、組織学的には全く異なっている。しかし、臨床的には部分層弁で剥離した角化歯肉を、非角化歯肉部に移動、縫合した際にも角化歯肉が獲得できる。我々はこの事実に着目し、非角化歯肉部位を分子生物学的に操作することにより、角化歯肉を獲得、維持出来るのではないかと考えた。つまり、角化歯肉組織に存在する細胞群が角化歯肉構成細胞へと分化、成熟していくメカニズムを解明し、その機序を人工的に誘導することで、非角化歯肉組織を構成する細胞や、未分化な細胞を直接的に角化歯肉に分化誘導し、角化歯肉を獲得することが可能となりうると着想した。そこで、我々はまず成熟した正常組織を用い、角化歯肉と非角化歯肉の違いを cDNA マイクロアレイにて網羅的に解析した。その結果、種々のサイトカイン、細胞外マトリックスなどの遺伝子群の発現に大きな差を見出した。一方、粘膜のように上皮と間葉からなる組織は、上皮-間葉相互作用によりその恒常性が維持され、この相互作用は間葉が優位に働くことが知られている。従って、非角化歯肉組織にはみられない角化歯肉組織の特徴的な表現型である角化上皮は、間葉による上皮組織制御で形成されるのではないかと考えた。実際、角化歯肉と非角化歯肉の間葉細胞の培養上清存在下でヒト口腔上皮細胞を培養したところ、角化歯肉の間葉細胞上清を加えた場合のみ、上皮細胞の角化に関連した遺伝子マーカーが上昇した。そこで、角化歯肉と非角化歯肉の間葉細胞の遺伝子発現の差を、PCR アレイで網羅的に解析した結果、発生や細胞骨格に関わる複数の遺伝子が候補として抽出された。

### 2. 研究の目的

基底膜は、上皮-間葉相互作用により形成され、上皮の発生および恒常性維持に非常に重要な細胞外マトリックスの構造物であり、組織によってその構成成分が異なることが知られている。基底膜の主要構成分子の一つである型コラーゲンは、3つの鎖が triple helix 構造を呈しており、その組み合わせは、1/ 1/ 2, 3/ 4/ 5, 5/ 5/ 6 の3つが知られ、1/ 1/ 2はあらゆる基底膜に広く分布するのに対し、3/ 4/ 5と 5/ 5/ 6は組織特異性を有している。実際、3/ 4/ 5は糸球体やボーマン嚢に分布し、その遺伝子変異により腎機能障害や眼科的異常を呈するアルポート症候群が発症することが知られており、基底膜の変化が臓器の機能に大きな影響を与えることが伺える。そこで本研究では、臓器の形成・維持に重要とされる基底膜の構成成分の相違が口腔粘膜上皮の角化・非角化を制御しているという仮説のもと、口腔粘膜の角化に関わる基底膜分子を同定し、その作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 角化歯肉(口蓋粘膜)と非角化歯肉(頬粘膜)における組織学的解析

マウス口腔内における口蓋粘膜と頬粘膜の相違を組織学的に検討するために、8週齢マウスの前頭断の凍結切片を作製し、HE染色およびKeratin10(KRT10)に対する免疫組織化学染色を行った。

#### (2) 口蓋粘膜と頬粘膜の基底膜構成成分の比較検討

口蓋粘膜と頬粘膜の基底膜構成成分の相違を解析するため、8週齢マウスの前頭断の凍結切片を使用し、基底膜を構成する主成分である、型コラーゲン 1- 6鎖に対して、免疫組織化学染色を行った。

#### (3) 発生期における歯肉角化と型コラーゲン 6鎖の発現解析

口蓋粘膜の発生期における 6鎖の発現と歯肉角化の時系列を検討するため、マウス胎生12.5日から18.5日の凍結切片を作製し、HE染色及び免疫組織化学染色を行った。

#### (4) Col4a6-KOマウスの解析

*in vivo*における型コラーゲン 6鎖の機能解析のためにCol4a6-KOマウスとWTマウスの口蓋粘膜において、KRT10に対する免疫組織化学染色を行った。

(5) ヒト口腔粘膜上皮細胞 (hGECs) の3次元培養

*in vitro*における型コラーゲン6鎖の機能解析のために、hGECsを細胞培養インサートにて、3次元培養し、RNAを抽出した。また、型コラーゲン6鎖の遺伝子発現抑制のためにCOL4A6に対するsiRNAを遺伝子導入し、同様に3次元培養を行い、RNAおよびタンパク質を抽出した。

(6) 統計解析

各データの統計学的有意性は、各条件に対して試料の数値を測定し、一元配置分散分析と多重比較検定、対応のないt検定を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 口蓋粘膜と頬粘膜における組織学的解析

HE染色より、マウス口蓋粘膜および頬粘膜ともに上皮最外層には角化した細胞層が観察された(図1A-C)。しかし、KRT10の発現は口蓋粘膜と遊離歯肉に観察され、頬粘膜には観察されなかった(図1D,E)。つまり、口蓋粘膜はKRT10陽性の角化組織であり、頬粘膜はKRT10陰性の非角化組織であることが確認された。

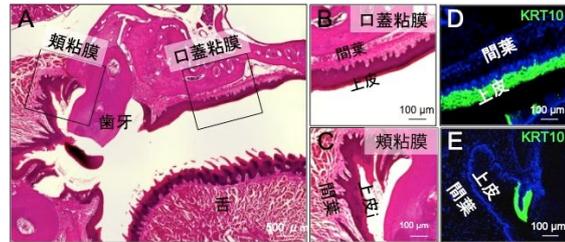


図1. 口蓋粘膜と頬粘膜における組織学的解析

(2) 口蓋粘膜と頬粘膜の基底膜における型コラーゲンの発現

頬粘膜と比較し口蓋粘膜の基底膜において型コラーゲン5鎖, 6鎖が高発現していることが確認された(図2I,J,K,L)。つまり、型コラーゲン5/5/6分子が角化粘膜に高発現していることが明らかとなった。

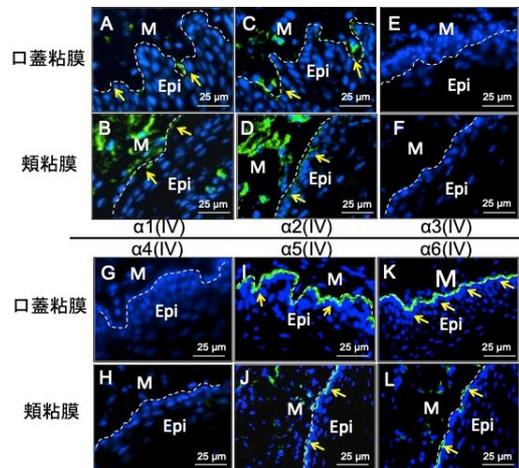
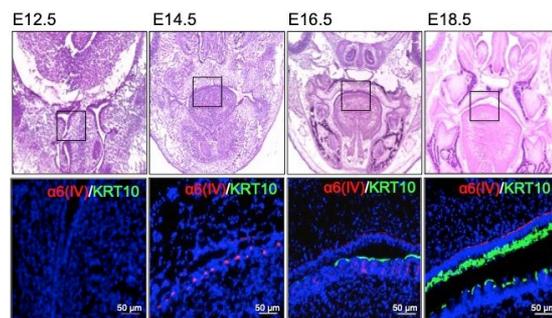


図2. 口蓋粘膜と頬粘膜に基底膜におけるIV型コラーゲンの発現  
M: 間葉組織 Epi: 上皮組織 点線: 基底膜 矢印: 陽性部位

(3) 発生期における型コラーゲン6鎖とkeratin 10の発現解析

口蓋粘膜においてKRT10は口蓋閉鎖後の胎生18.5日以降でその発現が確認された。一方、6鎖は口蓋の閉鎖より早く、胎生14.5日に発現を認め、発生とともに、その発現範囲部位が口蓋において拡大していく事が確認された(図3)。



(4) *in vivo*における型コラーゲン6鎖の機能解析

口蓋粘膜におけるKRT10の発現は生後0日および28週齢マウスではWTマウスと比較し、KOマウスにおいて有意に低下していた(図4)。つまり6鎖を含む5/5/6分子が口腔角化粘膜上皮の形成や角化の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

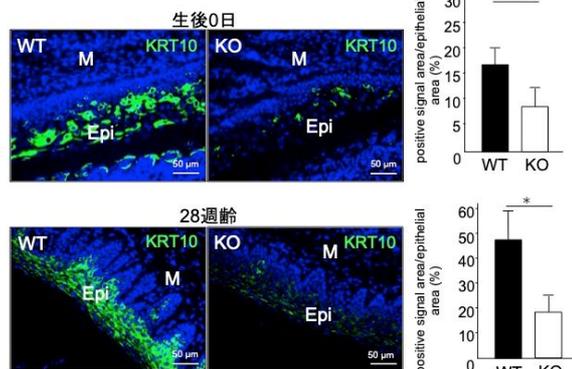


図4. *in vivo*におけるIV型コラーゲンα6鎖の機能解析  
M: 間葉組織 Epi: 上皮組織

(5) *in vitro*における型コラーゲン6鎖の機能解析

hGECsの3次元培養の結果、培養開始3日目にCOL4A6の遺伝子発現が認められ、7日目

まで発現上昇を認めた(図 5A)。一方, *KRT1* および *KRT10* は, 培養開始 3 日目まで発現変動を認めず, 培養 7 日目において有意な遺伝子発現の上昇を認めた(図 5B,C)。さらに *COL4A6* の遺伝子発現を抑制すると, *KRT1* と *KRT10* の発現は有意に低下した(図 5D-F)。また, *KRT10* のタンパク質の発現も低下していることが確認された(図 5G)。

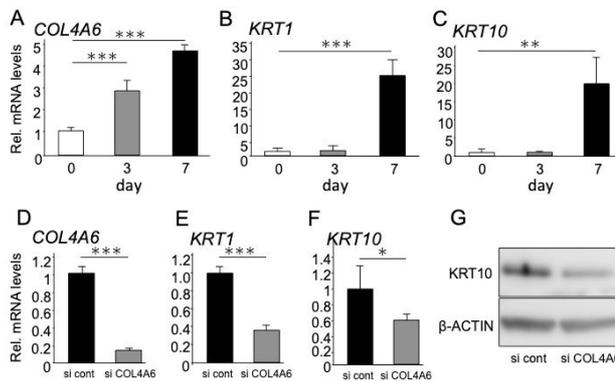


図5. *in vitro*におけるIV型コラーゲン $\alpha$ 6鎖の機能解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Komori T, Ono M, Hara ES, Ueda J, Nguyen HTT, Nguyen HT, Yonezawa T, Maeba T, Ono A, Takarada T, Momota R, Maekawa K, Kuboki T, Oohashi T, Type IV collagen 6 chain is a regulator of keratin 10 in keratinization of oral mucosal epithelium, Scientific Reports, 8, doi:10.1038/s41598-018-21000-0, 2018 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

小盛大志, 大野充昭, 植田淳二, Nguyen Thi Thu Ha, 前川賢治, 大橋俊孝, 窪木拓男. 基底膜構成分子 Type IV collagen 6 は口腔粘膜上皮の角化を制御する. 第 127 回日本補綴歯科学会学術大会, 2018.

小盛大志, 大野充昭, 植田淳二, Nguyen Thi Thu Ha, 前川賢治, 窪木拓男. 口腔粘膜上皮の角化制御における Collagen 6 の役割. 第 48 回口腔インプラント学会学術大会, 2017.

T. Komori, J. Ueda, W. Sonoyama, M. Ono, ES. Hara, Y. Yoshioka, K. Maekawa and T. Kuboki: Regulation of gingival keratinization by laminin332. 95<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2017.

植田淳二, 大野充昭, 小盛大志, 吉岡祐也, 園山 亘, 前川賢治, 窪木拓男. 口腔粘膜上皮における角化因子の探索. 第 125 回日本補綴歯科学会学術大会, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 角化歯肉誘導剤

発明者: 窪木拓男, 大野充昭, 前川賢治, 植田淳二, 小盛大志

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特開 2017-218405

出願年: 平成 28 年

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：大野 充昭  
ローマ字氏名：ONO Mitsuaki  
所属研究機関名：岡山大学  
部局名：医歯薬学総合研究科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：60613156

研究分担者氏名：渡辺 亮  
ローマ字氏名：WATANABE Akira  
所属研究機関名：京都大学  
部局名：iPS細胞研究所  
職名：特定拠点助教  
研究者番号（8桁）：60506765

研究分担者氏名：大島 正充  
ローマ字氏名：OSHIMA Mamitsu  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：大学院医歯薬学研究部  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：00548307

研究分担者氏名：秋山 謙太郎  
ローマ字氏名：AKIYAMA Kentarou  
所属研究機関名：岡山大学  
部局名：大学病院  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：70423291

研究分担者氏名：窪木 拓男  
ローマ字氏名：KUBOKI Takuo  
所属研究機関名：岡山大学  
部局名：医歯薬学総合研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：00225195

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：該当なし  
ローマ字氏名：該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。