

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592105

研究課題名（和文） 口腔粘膜・皮膚の付属器におけるパールカンの役割
－上皮過剰発現系マウスによる解析－研究課題名（英文） The role of perlecan in the oral mucosa and the skin appendage
-Transgenic mice overexpression of perlecan-

研究代表者

依田 浩子（IDA HIROKO）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：60293213

研究成果の概要：

上皮組織構築とくに口腔粘膜、皮膚付属器における基底膜型ヘパラン硫酸プロテオグリカン・パールカンの役割を解明する目的で、パールカン上皮細胞過剰発現系トランスジェニック（Tg）マウスにおける *in vivo* での上皮組織の病的変化について、口腔粘膜および毛包をはじめとする皮膚付属器に着目して組織学的に検索した。その結果、毛包発育過程に乱れが生じ、上皮細胞の分化および毛包発育に關与する増殖因子ならびに転写因子に発現レベルの変化がみられた。したがって、パールカンの持続的発現により上皮細胞分化および皮膚付属器、とくに毛包発育にかかわるシグナル伝達経路が障害され、分化の乱れを生じる可能性が示唆された。

さらに、パールカン Tg マウスにおける口腔粘膜・皮膚創傷治癒実験では、表皮再生が促進されており、パールカンがケラチノサイトの増殖および分化を制御している可能性がしめされた。したがって、上皮細胞の産生するパールカンが上皮組織構築に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：ヘパラン硫酸プロテオグリカン、パールカン、トランスジェニックマウス、口腔粘膜、皮膚付属器、上皮過剰発現、ケラチン 5 プロモータ、細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

基底膜型へパラン硫酸プロテオグリカン・パールカンは基底膜のみならず、腫瘍間質や肉芽組織など生体内に広く分布し、腫瘍細胞の増殖・浸潤や炎症組織の改造をはじめ生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが判明しつつある。近年、われわれは、歯胚組織および歯原性腫瘍において、星状網様上皮細胞間におけるパールカンの存在を証明し、上皮細胞の分化や血管侵入のない上皮組織内での物質輸送に関与している可能性を示した。また、唾液腺組織においても、炎症や腫瘍等の病的状態において、上皮細胞のパールカン産生量が亢進することをみいだしてきた。さらに口腔粘膜上皮においては、異型上皮および扁平上皮癌において上皮細胞間隙が拡大し、上皮細胞間にパールカンが過剰に沈着し、上皮の癌化過程にパールカンが関与している可能性をみいだした。すなわち、間質空間にのみ存在すると信じられてきた細胞外基質が上皮組織内にも存在することが判明したが、上皮組織内でのパールカンの局在と機能に関してはいまだ不明な点が多かった。

そこで、我々は上皮組織構築におけるパールカンの機能を解明する目的で、ケラチン5プロモータをもちいて、上皮細胞にパールカンを過剰発現させるトランスジェニックマウスの作製に成功し、まず歯胚組織について解析した。その結果、歯胚組織に形成異常が確認され、歯胚上皮細胞によるパールカンの持続的発現により、歯胚発育過程での時期特異的な上皮-間葉相互作用に

乱れが生じることを明らかにした。したがって、他の上皮組織においても変化が生じているものと予測された。

2. 研究の目的

上皮組織全般とくに口腔粘膜、唾液腺組織および皮膚付属器に焦点をおき、パールカン過剰発現の影響を明らかにし、パールカンが上皮組織の形態形成および恒常性維持にどのように関与しているかを具体的に証明し、さらに上皮細胞におけるパールカン関連シグナル伝達経路を解明することを目的とした。上皮組織内には細胞外基質分子が存在して上皮細胞の分化や増殖の制御、および上皮細胞への物質輸送を担っていることを初めて明らかにすることにより、口腔粘膜ならびに皮膚疾患の原因解明と移植治療法の開発、さらには各種上皮組織（歯、唾液腺、毛髪、皮膚等）の再生誘導に重要な知見がえられ、今後の再生医療の発展にも多大な貢献をすることが期待される。

3. 研究の方法

第一に、マウス正常皮膚組織ならびに口腔粘膜組織の発生過程におけるパールカンの局在を免疫組織化学的に検索した。

第二に、パールカントランスジェニックマウスにおける *in vivo* での上皮組織の病的変化について、口腔粘膜、その付属器としての唾液腺および毛包をはじめとする皮膚付属器に着目して組織学的に検索した。次に、形態異常ないしは病的変化が確認された上皮組織より RNA を抽出し、パールカン過剰発現により遺

伝子発現レベルが変化すると予想された種々の因子について RT-PCR 法にて遺伝子発現変化を解析した。さらに、レーザーマイクロダイセクション法をもちいて、組織切片から特定の上皮細胞を採取し、RNA 抽出後 RT-PCR 法をおこない、パールカン関連分子の遺伝子発現変化について検索した。

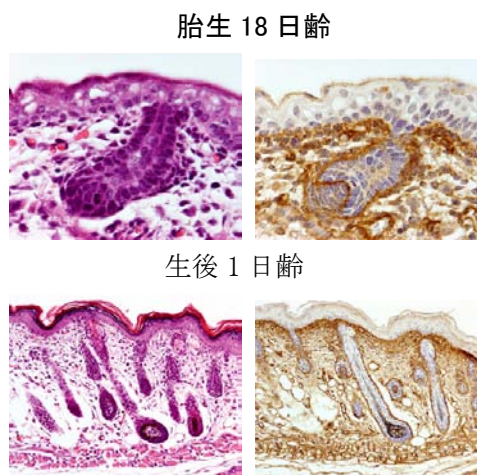
第三に、in vivo での創傷治癒実験として、正常およびトランスジェニックマウスの口腔粘膜および背部皮膚組織に線状創を作製し、上皮および毛包をはじめとする皮膚付属器の再生過程を経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) マウス正常皮膚組織におけるパールカンの局在

胎生期から生後 8 週齢の正常マウス頭部皮膚組織のパラフィン連続切片を作製し、マウス皮膚付属器の発育過程におけるパールカンの局在について酵素抗体法にて検索した。毛包発育過程では、パールカンは上皮基底膜および毛包基底膜に限局して存在するとともに、毛包周囲の結合組織性間質にもび漫性に局在していた (図 1)。

<図 1>

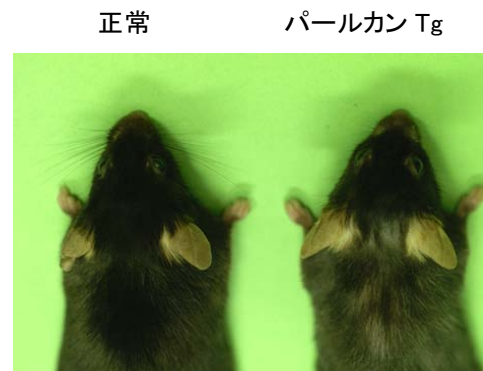


(2) パールカン Tg マウスの皮膚付属器の組織学的検索

① 免疫組織化学的検索

胎生期および出生後の正常およびパールカン Tg マウスについて、HE 染色、パールカン関連分子の免疫染色を施し、毛包をはじめとする皮膚付属器の組織学的変化を経時的に観察した。その結果、Tg マウスではパールカン蛋白質は基底膜のみならず、ケラチン 5 に一致して上皮基底・傍基底細胞層、毛包外毛根鞘に過剰発現していた。さらに、Tg マウスでは加齢にともない背部および頭部皮膚に脱毛が生じ (図 2)、組織学的には表層上皮組織には角化亢進と過形成、毛包組織では毛包上皮細胞の分化の乱れ、外毛根鞘細胞の腫大と多層化、皮脂腺組織の発達が確認された。

<図 2>



② 定量的 RT-PCR による遺伝子発現変化の解析

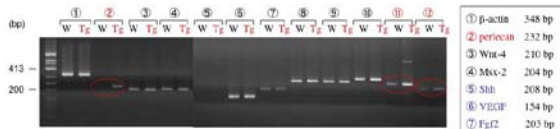
生後 8 週齢および生後 1 年齢の老齢マウスの正常およびパールカン Tg マウスより皮膚組織を採取し、RNA を抽出後 cDNA に逆転写し、パールカンおよび上皮細胞分化関連因子について、定量 RT-PCR 法にて遺伝子発現の経時的変化を解析した。その結果、時期特異的に *lef-1*、*shh*、*TGF-1* などの各種転写因子や成長因子の遺伝子発現レベルに変化がみられ、免疫組織化学にて同蛋

白質発現にも変化が生じていることが確認された (図 3)。

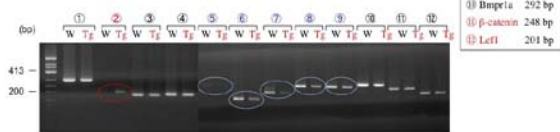
<図 3>

遺伝子発現の変化：背部皮膚組織

生後8週齢：β-catenin、Lef1上昇



生後1年齢：増殖因子の減少



さらに、病的変化が確認された上皮組織より RNA を抽出し、RT-PCR 法にてパールカン関連分子の遺伝子発現変化について検索したところ、上皮細胞の分化および毛包発育に關与する増殖因子ならびに転写因子に発現レベルの変化がみられた。したがって、パールカンの持続的発現により上皮細胞分化および皮膚付属器、とくに毛包発育にかかわるシグナル伝達経路が障害され、分化の乱れを生じる可能性が示唆され、上皮細胞の産生するパールカンが上皮組織構築に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

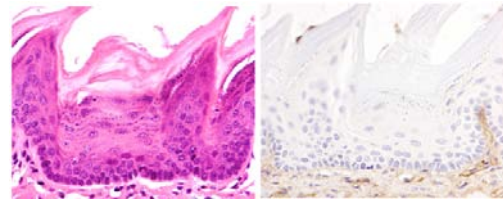
(3)パールカン Tg マウスの口腔粘膜組織の組織学的検索

胎生期から生後 1 年齢の正常マウス頭部およびパールカン Tg マウス背部皮膚組織のパラフィン連続切片を作製し、口腔粘膜におけるパールカンの局在について酵素抗体法にて検索した。正常マウスの口腔粘膜上皮組織では、パールカンは上皮基底膜に限局

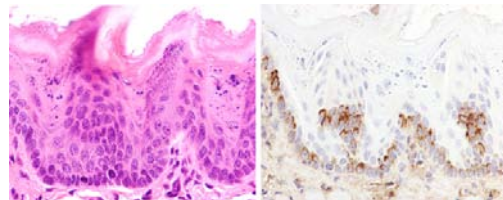
していたが、Tg マウスでは基底細胞および傍基底細胞間にパールカンが沈着し、基底膜も肥厚していた。同時に、基底細胞配列の乱れもみられた (図 4)。

<図 4>

正常マウス



パールカン Tg マウス



(4) パールカン Tg マウスの創傷治癒モデルにおける上皮再生実験

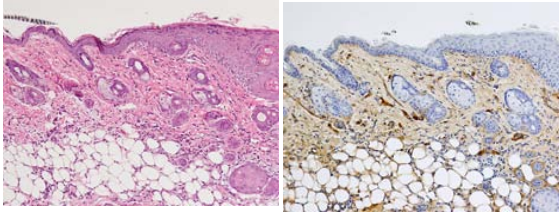
① 病理組織学的検索

10 週齢の正常およびパールカン Tg マウスの背部皮膚に線状創を作製したのち、1 日から 14 日まで経時的に組織を採取して、パラフィン連続切片を作製し、各種上皮細胞分化マーカーの免疫組織化学をおこない、経時的に観察した。その結果、パールカン Tg マウスでは創傷 3 日後で創部周囲表皮が広範に過形成を示すとともに、基底細胞層に BrdU 陽性細胞がより多数出現し、基底膜域のパールカン沈着が強調されていた (図 5)。潰瘍底部では大型紡錘形再生表皮細胞が伸長していた。創傷 5 日後のパールカン Tg マウス表皮では、痂皮が脱落して CK5 陽性の基底細胞層および CK10 陽性の棘細胞層・角化層の分化が完了していたが、正常マウスでは基底方向ならびに表層

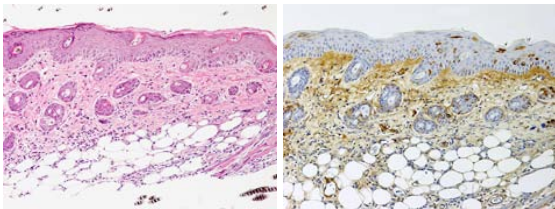
方向への分化はいずれも不完全であり、最表層には痂皮が残存していた。8日以降は顕著な差はなかった。

<図 5>

正常マウス



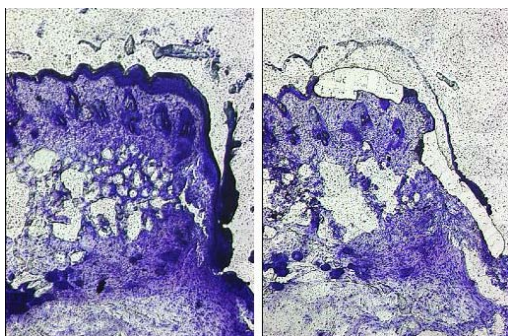
パールカン Tg マウス



② 遺伝子解析

経時的に採取された創部組織の一部より凍結切片を作製し、レーザーマイクロダイセクション法により、正常、周囲過形成表皮および再生表皮をそれぞれ採取した(図6)。RNAを抽出後cDNAに逆転写し、上皮細胞分化関連因子について遺伝子発現の変化をRT-PCR法にて解析した。その結果、パールカン Tg マウスの周囲過形成表皮では、インテグリンβ1、BMP-4などの上皮再生にかかわるパールカン関連因子の発現上昇がみられた。

<図 6>



したがって、上皮細胞によるパールカンの持続的過剰発現により、パールカン Tg マウスでは皮膚創傷治癒過程初期における表皮再生が促進されていることが明らかとなり、パールカンがケラチノサイトの増殖および分化を制御している可能性がしめされた。

以上の研究結果より、上皮細胞によるパールカンの持続的発現により、上皮-間葉相互作用に乱れが生じ、皮膚付属器とくに毛包構造の分化が障害されることが示唆された。したがって、上皮細胞の産生するパールカンが皮膚・粘膜付属器の発育分化に関与している可能性が推察された。さらに、創傷治癒実験により、上皮細胞が産生するパールカンが自身の細胞増殖ならびに分化を制御していることが証明され、今後はパールカン遺伝子を過剰発現している上皮細胞の培養実験系を確立し、上皮細胞の分化および上皮組織構築にかかわるパールカンの機能を *in vitro* で解析したいと考えている。それにより、各種上皮組織の再生誘導(歯、毛髪、皮膚など)に重要な知見がえられ、今後の医療の発展にも多大な貢献をすることが期待される。

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 2 件)

1. Tilakaratne WH, Kobayashi T, Ida-Yonemochi H, Swelam W, Yamazaki M, Mikami T, Alvarado CG, Shahidul AMd, Maruyama S, Cheng J, Saku T. Matrix metalloproteinase 7 and perlecan in oralepithelial dysplasia and carcinoma in situ: an aid for histopathologic recognition

of their cell proliferation centers. Journal of Oral Pathology & Medicine, 38, 348-355, 2009, 査読有.

2. Tsuneki M, Cheng J, Maruyama S, Ida-Yonemochi H, Nakajima M, Saku T. Perlecan-rich epithelial linings as a background of proliferative potentials of keratocystic odontogenic tumor. Journal of Oral Pathology & Medicine, 37, 287-293, 2008, 査読有.

[学会発表] (計 7 件)

1. Ida H: Perlecan, a basement membrane-type heparin sulfate proteoglycan, regulates the enamel organ morphogenesis. Seminar in Yonsei University, ソウル, 韓国, 2008. 11. 28.
2. 依田浩子, 朔 敬. ジストログリカン はマウス歯胚エナメル器細胞においてパールカン受容体として機能している 第50回歯科基礎医学会学術大会, 2008年9月23日、東京都
3. Shahidul AM, Cheng J, Maruyama S, Ida-Yonemochi H, Saku T. Multiple signaling pathways for perlecan in adenoid cystic carcinoma. 第19回日本臨床口腔病理学会, 東京, 2008年8月20-22日, Oral Med Pathol 13: 37, 2008.
4. Ida-Yonemochi H, Ahsan MS and Saku T. Differential distribution modes of perlecan receptors, dystroglycan and integrin $\beta 1$, in ameloblastomas. 14th International Meeting of International Association of Oral Pathologists, San Francisco, California, United States, June 22-26, 2008. Supplementary Meeting Abstracts: 57.
5. Ahsan S, Cheng J, Maruyama S, Ida-Yonemochi H, Kobayashi T,

Al-Eryani K, Kundu S, Alvarado C, Mikami T, Saku T. Comparative expression modes of dystroglycan and perlecan in oral carcinoma in-situ, 第97回日本病理学会総会, 金沢市, 2008年5月15-17日, 抄録集, 318, 2008.

6. Alvarado C, Cheng J, Maruyama S, Ida-Yonemochi H, Al-Eryani K, Ahsan S, Kundu S, Saku T. Immunohistochemical characterization of the two-phase appearance of oral precancerous lesions, 第97回日本病理学会総会, 金沢市, 2008年5月15-17日, 抄録集, 318, 2008.
7. 依田浩子, 里方一郎, 朔 敬: 皮膚創傷治癒における上皮再生はパールカンで促進される. 第49回歯科基礎医学会, 札幌市, 2007年8月29-31日, J Oral Biosci, 49 (S): 194, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依田 浩子 (IDA HIROKO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 60293213

(2) 研究分担者

丸山 智 (MARUYAMA SATOSHI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 30397161

程 珺 (CHENG JUN)

新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 40207460

朔 敬 (SAKU TAKASHI)

新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 40145264

(3) 連携研究者

なし

研究者番号: