

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893138

研究課題名(和文) 付着歯肉に特異的に発現する遺伝子・蛋白の同定とその機能解析

研究課題名(英文) The identification and functional analysis of attached gingiva related gene and protein

研究代表者

熊崎 明日香(正木明日香)(Kumazaki, Asuka)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：00713760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：付着歯肉特異的遺伝子の同定を目的に、ラットの付着歯肉および可動粘膜から間葉細胞を採取し、機能解析を行った。その結果、可動粘膜由来間葉細胞の方が、付着歯肉由来のものと比較し、細胞接着、増殖、遊走能は有意に高かった。次に、PFA固定にて固定されたこれらの線維芽細胞上にヒト上皮細胞株を播種し、上皮細胞の角化に与える影響を検討した。その結果、付着歯肉由来間葉細胞上で培養した方が有意に上皮細胞の角化は促進された。以上の結果より、間葉細胞の接着因子が上皮の角化を制御していることが明らかとなった。現在、cDNA microarrayのデータと照らし合わせ、網羅的に解析している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the specific gene of attached gingiva. First, to compare the ability of mesenchymal cells derived from attached gingiva and free gingiva, we collected them using out growth method. Mesenchymal cell derived from free gingiva had high ability in cell adhesion, proliferation, and migration, compared with attached gingiva. These data indicated mesenchymal cells derived from attached gingiva and free gingiva were completely different and we hypothesized that the mesenchymal cells were involved in the difference of attached gingiva and free gingiva. Therefore, next we performed the co-culture assay using human squamous cell carcinoma cells and confirmed that cell adhesion and extra cell matrix molecules are important for keratinization of epithelial cells. And from cDNA microarray data using mesenchymal tissue and epithelial tissue, several genes were selected as candidate factors of attached gingiva related gene, especially, keratinization.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：付着歯肉 可動粘膜 角化歯肉 上皮 間葉

## 1. 研究開始当初の背景

補綴物が長期にわたって安定して機能するためには、歯周組織の健康が欠かせない。なかでも、「付着歯肉」と呼ばれる組織の重要性は臨床医であれば当然認識しているところである。歯や補綴物の周囲に十分な付着歯肉が存在することは、過剰なメカニカルストレスから歯周組織を守り、予知性の高い予後をもたらす。そのため、付着歯肉が不足している場合には、口蓋部などから遊離歯肉弁移植術などにより付着歯肉を補う手術が行われている。しかし、そのドナーサイトの外科的な侵襲は患者の術後の大きな苦痛を引き起こすばかりか、移植片自体の生着率は決して高くない。したがって外科的侵襲が少なく付着歯肉を確実に獲得できる手法の開発が望まれている。

一方、遊離歯肉弁移植術において、部分層弁で剥離した付着歯肉を移動、縫合した際に再度付着歯肉が得られる事実を考え合わせると、移植組織自体に付着歯肉の形質を維持する能力が備わっているのか、あるいは、移植した付着歯肉から移植床に向かって何らかの因子が放出されていることが推測される。すなわち、術野に存在する細胞群が付着歯肉に分化成熟するメカニズムが明らかになれば、その因子を外因性に補ってやることで、可動粘膜を直接、付着歯肉に誘導することが可能かもしれない。

組織学的には「可動粘膜」は血管や神経に富み、非常に可動性に富む。「付着歯肉」は、骨の裏打ちがあり、線維組織に富み、上皮は強く角化している。この両者は、口腔内において連続して存在するにもかかわらず、全く異なる性質を持っている。そこで、成熟した組織にスポットを当て可動粘膜と付着歯肉の違いを cDNA microarray にて網羅的に解析を行なった。その結果、サイトカインや細胞外マトリックス、接着因子などの遺伝子群において 2 群間で大きな差を認めた。しかし、

特異的な遺伝子の同定までには至らなかった。

その要因の 1 つとして、付着歯肉、可動粘膜の発生学的理解の欠如が考えられる。我々の研究チームは、歯の発生において重要な役割を果たしている因子の探索を目的に、マウス遺伝子発現データベース“EMBRY”を応用し、すでに報告されている遺伝子群に加えて、28 個の関連未報告遺伝子を同定することに成功した (Yokoyama et al., Uchibe et al.)。つまり本手法を応用することで、網羅的に付着歯肉および可動粘膜の発生メカニズムを解明できるのではないかと考えた。さらに、付着歯肉、可動粘膜を細胞生物学的に理解することで、それらに関わる因子の同定につながるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

様々な組織において、間葉組織が上皮組織の性質を制御していることから、間葉組織に着目し、本研究では、付着歯肉および可動粘膜から間葉細胞を採取し、その違いを cDNA microarray などを駆使し、細胞生物学的に明らかにし、マウス遺伝子発現データベース“EMBRY”のデータと照らし合わせ、付着歯肉特異的遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット付着歯肉、可動粘膜の組織学的解析

岡山大学動物実験委員会承認のもと、すべての動物実験を実施した。初めに、付着歯肉、可動粘膜を組織学的に理解するため、脱灰パラフィン組織切片を作製した、免疫組織染色およびヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

### (2) ラット付着歯肉、可動粘膜からの間葉細胞の分離および機能解析

ラット付着歯肉、可動粘膜から out growth

法を用い、間葉細胞の分離を行った。実際には、ラット口腔粘膜をイソジンにて染色し、付着歯肉、可動粘膜の境界を明示し、お互いの組織が混ざらないように十分量のマージンを取り、実体顕微鏡下にて採取した。付着歯肉、可動粘膜が特異的に採取出来ているかを、それぞれの組織の特異的マーカーである Keratin 1 (K1), K10, Elastin の遺伝子発現量を指標に評価した。また、採取した組織は 2 mm 四方に切り、培養皿に採取した組織を静置した。組織を培養皿に接着させるために、37 度にて 5 分間インキュベートし、5 分後に組織が剥れないように培地 (alpha-MEM with 10% FBS) を加え、3 週間培養した。3 週後に Accutase を用い細胞を回収し、実験に使用した。

付着歯肉および可動粘膜由来間葉細胞の違いを検討するため、細胞接着試験、細胞増殖試験、細胞遊走試験を実施した。細胞接着能、細胞増殖能は MTS 法 (Promega) にて検討した。細胞遊走能、走化性は、それぞれボイデンチャンバー法およびスクラッチアッセイにて評価した。

### (3) 上皮・間葉細胞共培養モデルを用いた、間葉細胞の機能解析

上皮・間葉細胞共培養モデルを用い、付着歯肉由来および可動粘膜由来間葉細胞が上皮の分化に与える影響に関して以下の 3 通りの方法を用い実施した。また、上皮細胞にはヒト口腔扁平上皮癌細胞 (Cell Line, TR146: DS ファーマバイオメディカル株式会社) を使用し、上皮細胞の培養には細胞インサートチャンバーを用いた。また、付着歯肉は可動粘膜と比べ表層が角化していることが知られている。そこで、上皮の角化のマーカーである K1, K10 の発現量を指標に間葉細胞が上皮細胞に与える影響を定量性 RT-PCR 法にて評価した。また、定量性 RT-PCR 法にはラットには反応しない、ヒト特異的なプラ

イマーを設計し使用した。

細胞インサートチャンバー上に付着歯肉、可動粘膜由来間葉細胞を播種した。24 時間後に間葉細胞の上に上皮細胞を播種し、28 日間培養した。

細胞インサートチャンバー上に付着歯肉、可動粘膜由来間葉細胞を播種した。24 時間後に間葉細胞を PFA にて固定し、固定した間葉細胞の上に上皮細胞を播種し 28 日間培養した (細胞接着因子、細胞外マトリックスの関与の検討)

付着歯肉、可動粘膜由来間葉細胞を 1% FBS 含有培地にて 24 時間培養し、その培養液を回収した。上皮細胞を細胞インサートチャンバー上に播種し 28 日間、間葉細胞由来培養液刺激下にて、培養した。(細胞が分泌する液成分の関与の検討)

### (4) cDNA microarray 解析

ラットの付着歯肉および可動粘膜組織の cDNA microarray 解析と実験 との結果を照らしあわせ、付着歯肉の特徴の一つである角化に関わる因子の同定した。

## 4. 研究成果

### (1) ラット付着歯肉、可動粘膜の組織学的解析

初めに、付着歯肉、可動粘膜を組織学的に理解するため、脱灰パラフィン組織切片を作製した。その結果、付着歯肉上皮には可動粘膜上皮と比較し K1, K10 が高発現していることを組織免疫学的手法を用い確認した。また、付着歯肉の間葉組織は可動粘膜のものに比べ、細胞の密度が高く、明らかに異なった組織像を示した。

### (2) ラット付着歯肉、可動粘膜からの間葉細胞の分離および機能解析

実体顕微鏡下にて採取した付着歯肉、可動

粘膜が特異的に採取出来ているかを、確認するため、それぞれの組織の特異的マーカーである K1, K10, Elastin の遺伝子発現量を指標に評価した。その結果、うまく2つの組織が分離し回収できていることが確認された。また、それぞれの組織から採取した細胞の機能解析を実施した。その結果、細胞増殖能、細胞遊走能、細胞遊走、走化能はすべて可動粘膜由来間葉細胞の方が高かった。

### (3) 上皮・間葉細胞共培養モデルを用いた、間葉細胞の機能解析

実験の結果、付着歯肉由来間葉細胞は可動粘膜由来間葉細胞と比較し、ヒトの上皮細胞の角化を促進した。次に、細胞接着因子、細胞外マトリックスの関与を検討するため、実験を実施した。その結果、実験においても付着歯肉由来間葉細胞は上皮細胞の角化を促進した。最後に、細胞が分泌する液成分の関与を検討するため、実験を実施した。その結果、二群において、有意な差を認めなかった。つまり、間葉細胞の細胞接着因子もしくは細胞外マトリックスが上皮の付着歯肉の特徴の一つである角化に関与していることが明らかとなった。

### (4) cDNA microarray 解析

実験の結果から、細胞接着因子、細胞外マトリックスの関与が示唆された。そこで、細胞接着因子および細胞外マトリックスのGO解析を実施した。その結果、いくつかの細胞接着因子、wnt シグナル経路を制御している細胞外マトリックスが抽出された。

これらの因子に関し、現在リコンビナントタンパク質を用いた機能解析を *in vitro* に実施し、関連因子を同定しつつある。今後は、関連因子に関し、*in vitro*, *ex vivo* において過剰発現、発現抑制実験を行い、その詳細なメカニズムを検討する予定である。

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕特になし

### 6. 研究組織

研究代表者

熊崎(正木) 明日香(KUMAZAKI ASUKA)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号: 00713760

研究協力者

窪木 拓男(KUBOKI TAKUO)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

インプラント再生補綴学分野・教授

研究協力者

大野 充昭(ONO MITSUAKI)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

インプラント再生補綴学分野・助教

研究協力者

植田 淳二(UEDA JUNJI)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

インプラント再生補綴学分野・大学院生