

令和元年9月13日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05558

研究課題名(和文) 歯 歯肉付着上皮の封鎖を標的とした歯周病制御

研究課題名(英文) Junctional epithelial barrier in gingiva and periodontal diseases

研究代表者

城戸 瑞穂 (Kido, Mizuho)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：60253457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は、歯の喪失により飲食が阻害されるだけでなく、発語など行動にも影響し生活の質を低下される。歯周病は心血管障害や認知症の増悪、低体重児の出産など全身に影響することから、その解決の重要性は増している。本研究では歯周病の発症部位である歯肉付着上皮に着目し、歯と歯肉付着上皮の接着に関わる陽イオンチャネルメカノセンサーを標的にし研究を行った。そして、この標的イオンチャネルが歯肉付着上皮の細胞増殖や細胞移動、細胞間の接着を制御し、外来物質の透過性を制御することを明らかにした。遺伝子欠失マウスでは歯周病モデルマウスでは歯槽骨減少がより観察されたことからこの分子は歯周病治療の標的となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病発症部位である歯肉付着上皮において、非選択的陽イオンチャネルが強く発現し、このメカノセンサーイオンチャネルが細胞間の接着や細胞移動など歯肉付着上皮の特性を現す機能に関わることを示すことができた。このことは、歯肉付着上皮におけるこのメカノセンサーイオンチャネルを標的として、硬組織である歯エナメル質と上皮との封鎖の制御による病態の制御の可能性の一つの道を拓く基礎的な知見となったと考えている。

研究成果の概要(英文)：Periodontal diseases are prevalent in Japan and are estimated at most 80% of population. High prevalence of periodontal disease in individuals makes it a public health concern. Robust evidence shows the association of periodontal diseases with systemic diseases such as cardiovascular disease, dementia or adverse pregnancy outcomes. Periodontal disease is characterized by chronic inflammation in tissues surrounding teeth after attacks by microorganisms followed by host immune responses. The initial site of disease onset is considered to be the junctional epithelium, which forms a unique epithelial attachment to teeth. Using mouse model, we found out that high expression of mechanosensitive ion channel in the junctional epithelium and the epithelial cell-cell adhesion, proliferation, and migration was modulated via this ion channel activities.

研究分野：組織細胞生物学

キーワード：上皮 細胞間接着 歯周病 イオンチャネル アドヘレンスジャンクション 歯肉付着上皮

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯肉の慢性的な炎症から歯槽骨の吸収を来し、歯の喪失に繋がる原因となる主たる疾患の1つである。現在、我が国では、成人の歯周病罹患率は8割とも言われる。歯周病による歯の喪失は、食事を困難にするだけでなく、顔貌の変化や発語など行動にも影響を与え、生活の質を低下させる。また、歯周病による慢性炎症は心血管障害や早産・低体重児の出産・糖尿病の増悪・誤嚥性肺炎の惹起・認知症との関連など全身への影響も知られてきており、社会における大きな課題の一つである。

現在の歯周病治療は、改良が加えられたとは言え、感染部の除去、歯面の清掃あるいは喪失した骨や歯の代替という対症療法域にあることは否めず、歯周病の根本的な解決には至っていないことから歯周病の根本的な治療の方法の開発は解決すべき重要な課題である。歯周病は「歯肉付着上皮」の炎症から始まる。歯肉付着上皮は襟巻きのように歯を取り囲み、硬組織である歯との間に「上皮性の付着」を形成している体内で唯一の上皮である。細菌や細菌由来の外毒素などの外的刺激が上皮性付着を壊し、宿主の免疫反応が歯周組織破壊へと繋がる。それ故、歯肉付着上皮の細胞間結合、歯肉付着上皮-エナメル質あるいは歯肉付着上皮-粘膜固有層との結合を適正に保つことが、歯周病やインプラント歯周炎制御の重要なアプローチの一つである。

上皮組織は細胞間に接着複合体を備え、外界との機能的な隔壁を形成している。ところが、歯肉付着上皮では細胞間接着が少ないが故に細胞間隙が広く、物質透過性が高く外からの攻撃を受けやすい。私たちは、歯肉付着上皮あるいはインプラント周囲上皮について長年研究を重ね、物質透過性の形態学的な根拠を示してきた。

口腔上皮あるいは歯肉付着上皮は常に口腔からの多様な温度および物理機械刺激などに曝され、その刺激に適応し粘膜組織構築をダイナミックに変化させている。私たちは、口腔の刺激受容に環境センサーである TRP (transient receptor potential) チャネルが関与することを報告してきた。さらに、温度感受性チャネル TRPV3 (TRP vanilloid 3) が口腔上皮に特異的に発現し、創傷治癒を促進していることを報告した。

私たちは、温かい温度および機械刺激により活性化される TRPV4 が歯肉付着上皮に強く発現していることを見出した。TRPV4 は細胞間接着複合体を構成する分子群と直接タンパク間相互作用をすることが報告されている。そこで、歯肉付着上皮に高発現するメカノセンサーTRPV4 を介した細胞間接着制機能解明が治療戦略の一つになり得るとの着想に至った。

2. 研究の目的

歯肉付着上皮とエナメル質との接着の重要性は広く認識されている一方で、封鎖や破綻の実態は明確でない。そこで、温度感受性のメカノレセプターTRPV4 を介した歯-歯肉付着上皮の付着構築の機構を明らかにする。

具体的には、歯肉付着上皮に特異的に発現し上皮細胞間接着に関連するメカノセンサーである TRPV4 チャネルを標的として、歯肉付着上皮における上皮細胞間接着の機構の、

歯周組織の外来物透過への TRPV4 の関与、口腔粘膜の上皮細胞における細胞間の接着機構への TRPV4 による制御機構の解明を行った。

3. 研究の方法

実験には C57Bl/6 および TRPV4 遺伝子欠失 (TRPV4KO) マウスを用いた。実験計画は、九州大学動物実験委員会にて承認を受け実施した。

① マウス正常歯肉付着上皮細胞間接着・増殖・細胞移動への TRPV4 関与の解明

a. 細胞間接着機構の解明

新たに作製した TRPV4 特異的抗体を用いて、歯肉組織における細胞間接着機構に関わる分子群との関連を免疫組織化学的手法により調べた。

b. 細胞増殖への影響

歯肉付着上皮は他の口腔上皮よりも旺盛な増殖活性を有し、turn over が速いことが知られている。上皮の挙動に重要である細胞増殖における TRPV4 欠失の影響を細胞増殖のマーカーである Ki67 の染色および増殖細胞の DNA に取り込まれる EdU の標識を行い免疫組織学的に可視化し顕微鏡にて観察した。

c. 細胞移動への影響

野生型および TRPV4KO マウスから採取した口腔上皮初代培養細胞の細胞移動能をリアルタイムで観察し、形態変化・移動挙動を比較した。

d. 歯肉への外来物透過能への影響

野生型および TRPV4KO マウスの歯肉に蛍光色素標識デキストランを投与し、組織への進入程度を評価した。

② 野生型および TRPV4KO 歯周炎マウスの細胞間接着装置の機能的変化の解明

歯周炎モデルは Abe らの方法 (J Immunol Methods, 2013) を採用し、5-0 絹糸にて上顎第二大臼歯を結紮し、結紮後 3-10 日の間で段階的にマウスを固定した。マウスより上顎組織を採取し、マイクロ CT により第一臼歯遠心から第三臼歯近心までの領域の歯槽骨の三次元解析を行い、骨減少程度を比較した。さらに、上顎組織を脱灰し、切片を作製し歯周組織の変化を解析した。

4. 研究成果

TRPV4 はマウス歯肉付着上皮に顕著に発現していた。その発現は歯肉溝上皮や口腔上皮にも認められたが、付着上皮における発現が強かった。細胞間接着分子群である β カテニンや E-cadherin, F-actin の発現は TRPV4KO 組織では野生型と比較して低かった。さらに、TRPV4KO から採取した初代培養細胞では、野生型に比べ細胞増殖が活発であった。また歯肉組織における増殖マーカーの発現は TRPV4KO 組織において野生型マウス組織よりもその数が有意に多かった。細胞移動アッセイにおいて、TRPV4KO 由来の初代培養細胞は野生型の細胞に比べ細胞移動が活発であった。歯肉

への外来物の進入程度は TRPV4 KO マウスにおいて野生型マウスより広がった。次に、歯周病への TRPV4 関与の解明を目指した、マウス歯周病モデルでは、TRPV4 KO マウスでは、歯槽骨吸収が野生型マウスに比べ多いことがわかった。

以上のことから、歯肉付着上皮に高発現する TRPV4 の調節により歯肉付着上皮への細菌や関連物質の侵入を制御することが治療の標的となりうることを示すことができたと考えている。

引用文献

1. Kido MA, Muroya H, Yamaza T, Terada Y, Tanaka T. Vanilloid receptor expression in the rat tongue and palate. *J Dent Res* 82: 393-397 2003
2. Wang B, Danjo A, Kajiya H, Okabe K, Kido MA. Oral epithelial cells are activated via TRP channels. *J Dent Res* 90: 163-167 2011
3. Aijima R, Wang B, Takao T, Mihara H, Kashio M, Ohsaki Y, Zhang JQ, Mizuno A, Suzuki M, Yamashita Y, Masuko S, Goto M, Tominaga M, Kido MA. The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia. *FASEBJ* 29:182-192 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. Enhanced junctional epithelial permeability in TRPV4-deficient mice. Kitsuki T, Yoshimoto RU, Aijima R, Hatakeyama J, Cao AL, Zhang JQ, Ohsaki Y, Mori Y, Kido MA. *J Periodontal Res.* 2019 Jul 25. doi: 10.1111/jre.12685.
2. Impaired Junctions and Invaded Macrophages in Oral Epithelia With Oral Pain. Yoshimoto RU, Aijima R, Ohya Y, Yoshizumi J, Kitsuki T, Ohsaki Y, Cao AL, Danjo A, Yamashita Y, Kiyoshima T, Kido MA. *J. Histochem and Cytochem* 2019; 67(4):245-256
3. The oral mucosal membrane and transient receptor potential channels. Kido MA, Yoshimoto RU, Aijima R, Cao AL, Gao WQ. *J Oral Sci.* 2017; 59(2):189-193.

〔学会発表〕（計 27 件）

1. 口腔粘膜の創傷治癒への温度感受性イオンチャネルの関与 城戸瑞穂、吉本怜子、倉島怜央奈、曹 愛琳、大崎康吉 第 124 回日本解剖学会総会 講演プログラム・抄録集 P144 2019.3.27-29 新潟市
2. Warm sensitive TRP channels and oral mucosal barrier. Yoshimoto RU, Ohsaki Y, Gao WQ, Cao AL, Kido MA. The 17th International Symposium of Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception 2018.11.30-12.02 福岡市
3. 口腔粘膜上皮バリアと温度感受性イオンチャネルの関わり 吉本怜子、清島 保、城戸瑞穂 第 95 回九大病理研究会 2018.12. 福岡市
4. マウス口蓋形成におけるメカノセンサーチャネル発現 本田裕子、曹 愛琳、吉本怜子、西山めぐみ、高 瑋琦、内野加穂、西田寛汰、田原愛理、村田祐造、城戸瑞穂 日本解剖学会第 74 回九州支部学術集会 2018.10.27 佐賀市
5. マウス骨組織におけるメカノセンサーイオンチャネルの発現と炎症 高 瑋琦、曹 愛琳、西山めぐみ、吉本怜子、本田裕子、内野加穂、西田寛汰、田原愛理、村田祐造、城戸瑞穂 日本解剖学会第 74 回九州支部学術集会 2018.10.27 佐賀市
6. 口腔粘膜の創傷治癒過程における温度感受性イオンチャネルの関わり 吉本怜子、倉

島怜央奈、曹 愛琳、大崎康吉、張 旌旗、藤井慎介、清島 保、西村英紀、城戸瑞穂 第 61 回秋季日本歯周病学会学術集会 2018.10.26-27 大阪市

7. 口腔粘膜上皮形成と温度感受性イオンチャネル 城戸瑞穂 第 60 回歯科基礎医学会学術大会 2018.9.5-7 福岡市
8. TRPV4 遺伝子欠失マウスにおける口腔粘膜創傷治癒の解析 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、藤井慎介、張 旌旗、曹愛琳、高瑋琦、清島 保、城戸瑞穂 第 60 回歯科基礎医学会学術大会 2018.9.5-7 福岡市
9. Warm activated TRPV4 enhanced oral epithelial cell-cell adhesion and suppresses migration Yoshimoto RU, Aijima R, Ohsaki Y, Cao AL, Zhang J, Kiyoshima T, Nishimura F, Kido MA. The 96th IADR London 2018.7.25-28 【IADR Hatton award competition】
10. 口腔粘膜の痛みと TRPV4 発現 吉本怜子、合島怜央奈、大山順子、吉住潤子、清島 保、城戸瑞穂 TRP 研究会 2018.5.24-25 岡崎市
11. 温度感受性イオンチャネルによる温度依存性の細胞間接着機構 吉本怜子、合島怜央奈、本田裕子、曹 愛琳、高 瑋琦、西山めぐみ、村田祐造、城戸瑞穂 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28-30 東京
12. 温度感受性イオンチャネル TRPV4 を介した口腔上皮細胞間接着と細胞移動の制御 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、清島 保、城戸瑞穂 Conbio 2017 神戸 2017.12.6-9
13. 温度感受性イオンチャネル TRPV4 による口腔上皮細胞の細胞間接着および細胞移動の制御 吉本怜子、清島 保、西村英紀、城戸瑞穂 第 147 回日本歯科保存学会学術大会 盛岡 2017.10.26-27
14. Oral barrier formation via temperature-sensitive TRP channels. Kido MA. The 69th Annual Meeting of The Korean Physiological Society, Seoul Korea. 2017.11.2 【招待講演】
15. 口腔粘膜における温度感受性 TRP チャネルのダイバーシティ 城戸瑞穂、吉本怜子、合島怜央奈、曹 愛琳、張 旌旗、大崎康吉 シンポジウム「受容体研究とリサーチライフダイバーシティ」 第 59 回歯科基礎医学会 塩尻市 2017.9.16-18
16. 温度感受性イオンチャネル TRPV4 は口腔上皮細胞の細胞間接着と運動性を制御する 吉本怜子、合島怜央奈、大崎康吉、張 旌旗、曹 愛琳、清島 保、城戸瑞穂 第 59 回歯科基礎医学会 塩尻市 2017.9.16-18 【モリタ優秀発表賞受賞】
17. TRP チャネルを標的とした口腔癌細胞制御 合島怜央奈、曹 愛琳、高 イキ、吉本怜子、森 啓輔、檀上 敦、山下佳雄、清島 保、城戸瑞穂 第 59 回歯科基礎医学会 塩尻市 2017.9.16-18 【モリタ優秀発表賞受賞】
18. Temperature sensitive TRP channels in Oral Mucosa. Kido MA, Aijima R, Yoshimoto RU, Kitsuki T, Cao AL, Zhang JQ, Ohsaki Y. 9th National Congress of Romanian Society of Cellular Biology with international participation Iasi Romania 2017.6. 7-11 【招待講演】
19. Epithelial barrier disorganization and oral pain. Yoshimoto RU, Aijima R, Ohshima Y, Yoshizumi J, Kiyoshima T, Kido MA. Gender Summit 10 satellite symposium Okinawa 2017.5.28-30,
20. ヒト口腔扁平上皮癌における温度感受性 TRP チャネルの役割 合島怜央奈、森 啓輔、下平大治、檀上 敦、山下佳雄、清島 保、城戸瑞穂 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 福岡 2017.01.26-27
21. 顎顔面の痛みとイオンチャネル 城戸瑞穂 日本顕微鏡学会第 58 回九州支部学術講演会、北九州市、2016. 12.3 【特別講演】

22. 温度感受性イオンチャネルによる口腔粘膜上皮の維持 城戸瑞穂 日本解剖学会第72回九州支部学術集会、長崎、2016.10.29 【特別講演】

〔図書〕（計 2 件）

1. 城戸瑞穂 第1章 人体の構造と機能 1. 人体の概要、2. 細胞 イラストでわかる 歯科医学の基礎 第3版 永末書店 p2-13, 2019
2. 城戸瑞穂 第1章 6 口腔粘膜組織 編集 村上伸也、網塚憲生、斎藤正寛、松本卓也 歯科再生医学 医歯薬出版 p 59-71, 2019

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：清島 保

ローマ字氏名：Kiyoshima Tamotsu

所属研究機関名：九州大学

部局名：歯学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：20264054

研究分担者氏名：合島 怜央奈

ローマ字氏名：Reona Aijima

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：30756143

研究分担者氏名：和田 裕子

ローマ字氏名：Hiroko Wada

所属研究機関名：九州大学

部局名：歯学研究院

職名：助教

研究者番号（8桁）：70380706

研究分担者氏名：張 旌旗

ローマ字氏名：Zhang Jing-Qi

所属研究機関名：九州大学

部局名：歯学部

職名：技術専門員

研究者番号（8桁）：80380707

※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。