

令和元年6月16日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11692

研究課題名(和文) 歯性感染症における異種細胞相互作用ならびに細胞極性調節因子と感染防御能の関連解析

研究課題名(英文) Association analysis of different cell interaction and cell polarity regulator and infection protective ability in odontogenic infection

研究代表者

石畑 清秀 (ISHIHATA, KIYOHIDE)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：10437957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯根嚢胞は、Malassez上皮遺残の増殖に由来する歯性感染症の一つであるが、その発症機序に関しては未だ、不明な点が多い。本研究では、根尖部病巣における、抗菌作用を解明することを目的として、根尖病巣ならびに歯原性上皮細胞株におけるEMTマーカー発現の様相とRho関連蛋白の発現について観察した。組織実験ならびに細胞実験いずれにおいてもE-カドヘリンの発現増強が確認された。しかしながら、N-カドヘリンの関与は今回の実験においては確認されなかった。また、Rho-ROCK遺伝子の一期的な発現上昇が確認され、歯性感染病巣における関わりが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、歯科領域において、発症頻度が高く、感染症の病態として扱われている歯根嚢胞を対象とし、他の感染症疾患では見られない感染環境下での上皮形成を感染に対する物理的な防御機構の一つという概念に置き換えている点に特色があり、さらに、細菌感染に対してRhoを有用な因子として想定している点は他に類がなく、独創的と言える。本研究から歯原性細胞の感染防御機構を解明できれば、歯根嚢胞が増悪して拔牙を余儀なくされていた症例に対しても、新しい治療の選択を付与できる可能性があり、学問的に重要な意味を持つとともに、歯牙を温存することを追求した本研究の結果は社会に大きな利益をもたらすことが期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Radicular cysts are one of the dental infections that originate from the proliferation of Malassez's epithelial residue, but the pathogenesis is still unknown. In this study, we investigated the expression of EMT markers and the expression of Rho-related proteins in apical lesions and odontogenic epithelial cell lines for the purpose of clarifying the antibacterial activity in the apical lesions. Enhanced expression of E-cadherin was confirmed in both tissue and cell experiments, however, involvement of N-cadherin was not confirmed in this experiment. In addition, one-step upregulation of Rho-ROCK gene was confirmed, suggesting involvement in odontogenic lesions.

研究分野：口腔外科

キーワード：歯性感染症 上皮形成 上皮間葉移行 Rho

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

1. 研究開始当初の背景

歯原性上皮細胞とは歯胚の外胚葉成分から発生した細胞成分である。歯胚の形態や細胞の分化は、歯の形成過程において、外胚葉性組織(上皮)と外胚葉性間葉の両者の複雑な誘導的相互作用によって制御されている。歯原性上皮細胞のなかに、歯根形成残遺歯原性上皮と呼ばれるものがある。この残遺上皮は、本来、アポトーシス抑制ならびに増殖抑制があり、死滅もしなければ増殖もしない細胞組織である。しかし、この残遺歯原性上皮の増殖に起因する疾患がある。炎症性刺激によって上皮増殖が起こる歯根嚢胞、PTCH 遺伝子、Gli-1,2 の関与が指摘されている角化嚢胞性歯原性腫瘍、Shh, Wnt, FGF などが増殖に関与するエナメル上皮腫などは残遺歯原性上皮細胞に由来する疾患と考えられているが、これらの疾患の発症機序は未だ明らかになっていない。歯根嚢胞や歯根肉芽腫は歯原性上皮(残存上皮)が増殖する疾患の中で比較的発症頻度の高い疾患である。その発生は歯原性残存上皮であるマラッセ残存上皮の増殖に由来すると考えられているが、その発症機序、増殖機構に関しては未だ不明な点が多い。また、根管治療を施しても治療困難な程増大した歯根嚢胞に関しては歯根端切除術あるいは拔牙が余儀なくされ、近代に至っても歯牙の予後に多大な影響を与えている。従来、根尖性病変発症には炎症性反応物質(マクロファージ、多核白血球、サイトカイン、ケモカイン)の関与が示唆されており、さらに、歯根嚢胞内容物からは、先天性免疫機構因子である抗菌ペプチドが含有されることが知られている。つまり、歯性感染症病変の上皮形成には自己防衛反応としての免疫機構、さらには感染波及を食い止めようとする自己防衛的な反応であると仮説できる。本研究を遂行するため、歯性感染症病変摘出切片ならびに、不死化ラット歯原性上皮細胞(HAT-7)、不死化マウス Hertwig 上皮鞘細胞(HERS01a)、間葉系線維芽細胞を用いた基礎的実験により、細菌感染環境下の裏装上皮形成過程における歯原性細胞の役割について分析する。さらに上皮系または間葉系の性質を有する細胞の相互作用によって発現する細胞性質変化を解析し、歯原性疾患との関連性について検討する。以上のような検討を行うことで、歯原性疾患についてのさらなる理解、それらの疾患に対する新たな治療法開発の可能性が期待される。

2. 研究の目的

歯根嚢胞上皮ならびに株化歯原性細胞から、細胞増殖や細胞極性に関連する物質の発現を確認し、それらの発現と嚢胞上皮形成との関連を検討すると共に、上皮系・間葉系の細胞を利用し、細菌感染時の細胞間相互作用と歯性感染症病変における上皮形成様式の関わりを解明することを本研究は目的としている。

3. 研究の方法

(1) 歯根嚢胞摘出切片における上皮系マーカー、細胞骨格関連タンパクの局在性の検討

・歯根嚢胞摘出切片における上皮系マーカーのマッピング図作成。

リンパ球の浸潤程度に従って、病期分類し、上皮形成様式のマッピング図を作成する。

・免疫組織学的染色法を利用した歯根嚢胞、歯根肉芽腫における Rho ファミリー(RhoA, RhoG, Rac, Cdc42)ならびに上皮系(E-cadherin)と間葉系(N-cadherin, Vimentin)マーカーの局在性を確認し、病期による上皮形成の変化を検証する。

・パラフィン固定された歯根嚢胞、歯根肉芽腫組織切片を 4 μM に切り出す。一次抗体(RhoA, RhoG, Rac, Cdc42, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin)はいずれも 200~400 倍希釈で使用する。

(2) 歯根嚢胞上皮摘出切片における増殖因子の同定・定量

- ・歯根嚢胞上皮における Rho ファミリー (RhoA , RhoG , Rac , Cdc42) の同定・定量
- ・歯根嚢胞摘出手術時に摘出された嚢胞から , 一部切片を切り出し , RNA 固定液内に浸し , -80 ° C にて保存する . 同定・定量時には常温にて溶解し , 十分なホモジナイズを行った上で PCR を行う . 摘出切片から total RNA を抽出し , 相補性 DNA 合成を行い , 個々の因子 (RhoA , RhoG , Rac , Cdc42) の定量性 PCR 用のプライマーを設計する . 定量性 PCR を行い個々の増殖因子の発現性について検討する . 定量性 PCR にて発現が同定された後 , 定量性 real time PCR を行い個々の増殖因子の発現量を比較検討する .

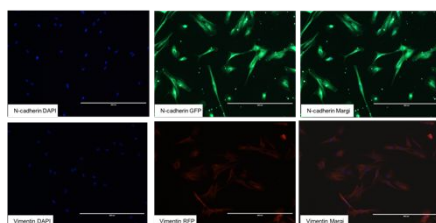
(3) 細菌感染環境下における株化細胞株 (上皮系 : HAT7 , HERS01 , 間葉系 : 線維芽細胞) における細胞形態変化 , 細胞性質変化の解析 .

- ・細胞骨格関連因子 : Rho ファミリー (RhoA , RhoG , Rac , Cdc42) ならびに上皮関連因子 (E-cadherin) の遺伝子学的発現ならびに組織学的局在性について PCR , real time PCR , 細胞免疫組織学的染色を用いて確認する . ・具体的には , 歯原性上皮 , 間葉系細胞単独培養下と共培養下に細菌菌体もしくは産生毒素 (LPS) を暴露させ , real time PCR を用いて Rho ファミリー (RhoA , RhoG , Rac , Cdc42) ならびに上皮関連 因子 (E-cadherin) の発現量を解析する . この際 , 単独培養下と共培養下での細胞性質変化の相違 点を抽出する .

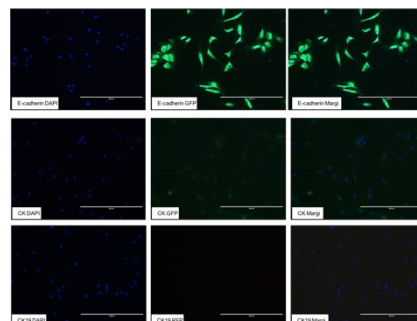
4 . 研究成果

歯牙の発生には , 外胚葉 (口腔 粘膜上皮) と神経堤由来の中胚葉 (外胚葉性間葉) との相互作用 (上皮間葉相互作用) を通して , 時間的・空間的に正確な細胞の増 殖と細胞死の調節が行われ形態形成・細胞分化が進行すると言われている . 従って歯性感染症発症時における 上皮増殖・形成機構には , 発生学的に性質の異なる 歯原性上皮細胞と間葉系細胞が , 互いに助け合いながら , 2 次バリアとしての裏装 上皮形成の一役を担っている可能性が示唆される . 歯根嚢胞や歯根肉芽腫は 歯原性上皮 (残存上皮) が増殖する疾患の中で比較的発症頻度の高い疾患である . その発生は歯原性残存上 皮であるマラッセ残存上皮の増殖に由来すると考えられているが , その発症機序 , 増殖機構に関しては未だ不明な点が多い . また , 根管 治療を施しても治療困難な程増大した歯根嚢胞に関しては歯根端切除術あるいは抜 歯が余儀なくされ , 近代に至っても歯牙の予後に多 大な影響を与えている . そこで , 歯根嚢胞上皮ならびに株化歯原性細胞から , 細胞増殖や細胞極性に関連す る物質の発現を確認し , それらの発現と嚢胞上皮形成との関連を検討することとし , 歯根嚢胞摘出切片から , 初代培養細胞を抽出し , 細菌刺激による同細胞の動 態変化を観察した . まず , 今回抽出された細胞は , 間葉系の性質を有した線維芽細胞様細胞であり , LPS 刺激によって細胞免疫染色では間葉系マーカーの減弱が観察された .

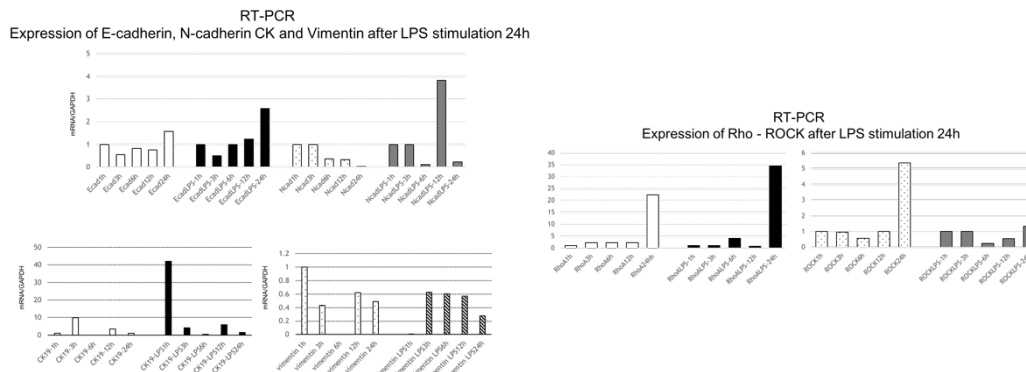
蛍光免疫染色 (間葉系マーカー : N-cadherin , Vimentin)



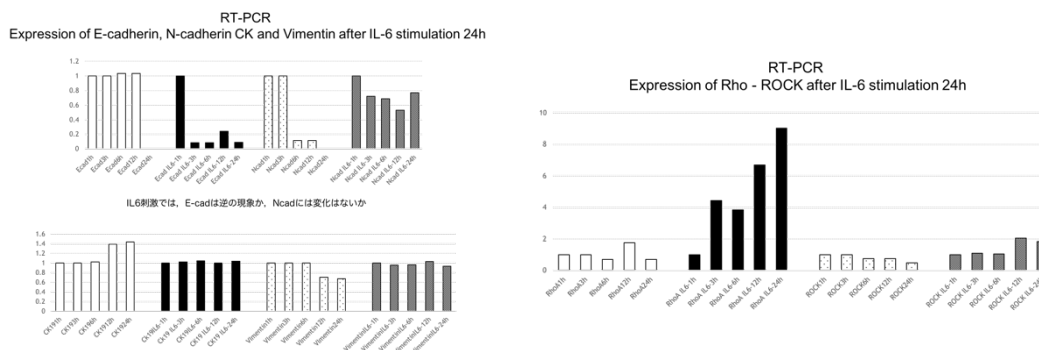
蛍光免疫染色 (上皮系マーカー : E-cadherin , CK , CK19)



根尖部嚢胞から採取した、初代培養細胞を、EMT 関連蛋白抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った結果、上皮系マーカーである E-cadherin, Cytokeratin は細胞質内に確認され、間葉系マーカーである N-cadherin, Vimentin は細胞内の核周辺に確認された。



細菌感染環境下、(LPS 刺激) では、歯根嚢胞初代培養細胞は E-cadherin の軽度上昇を認められたものの間葉系マーカーの発現には影響は認めなかった。また、RhoA の発現は、感染刺激後 24 時間にて発現上昇を認めたが、その下流にある ROCK の発現に変化は認めなかった。



LPS 刺激とは別に、実際のサイトカインを添加した状況で、同様に EMT マーカーの発現と RhoA 関連因子の発現変化を確認した。間葉系マーカーの発現には変化は認めず、RhoA の時間依存的な発現上昇を確認した。しかし、RhoA の下流にある ROCK の発現には変化は認めなかった。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. [Ishihata Kiyohide](#), [Kakihana Yasuyuki](#), [Yoshimura Takuya](#), [Murakami Juri](#), [Toyodome Soichiro](#), [Hijioka Hiroshi](#), [Nozoe Etsuro](#), [Nakamura Norifumi](#): Assessment of postoperative complications using E-PASS and APACHE II in patients undergoing oral and maxillofacial surgery, Patients Safety in surgery, 査読有り, 2018: pp1-14

2. [石畑清秀](#), [中村典史](#) 歯性感染病巣における上皮形成の意義 月間「細胞」査読無し, 2018 pp29-33

〔学会発表〕(計 1 件)

1. [Ishihata Kiyohide](#), [Kakihana Yasuyuki](#), [Yoshimura Takuya](#), [Murakami Juri](#), [Toyodome Soichiro](#), [Hijioka Hiroshi](#), [Nozoe Etsuro](#), [Nakamura Norifumi](#): Assessment of postoperative complications using E-PASS and APACHE II in patients undergoing oral and maxillofacial surgery, 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery 2017(国際学会) 2017 年 03 月 31 日~ 2017 年 04 月 03 日 Hong Kong

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

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

http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/Omfs2/r_ishihata.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中村 典史

ローマ字氏名：NAKAMURA NORIFUMI

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域歯学系

職名：教授

研究者番号(8桁)：60217875

研究分担者氏名：小松澤 均

ローマ字氏名：KOMATSUZAWA HITOSHI

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域歯学系

職名：教授

研究者番号(8桁)：90253088

研究分担者氏名：嶋 香織

ローマ字氏名：SHIMA KAORI

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域歯学系

職名：助教

研究者番号(8桁)：10343526

(2)研究協力者

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。