

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03841

研究課題名(和文) 基底膜構成分子の誘導制御による低侵襲角化歯肉獲得療法の確立

研究課題名(英文) Minimally invasive acquisition of keratinized gingival tissues by controlling of basement membrane component molecules induction.

研究代表者

前川 賢治 (MAEKAWA, Kenji)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20304313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：低侵襲な角化歯肉獲得療法の開発を目指す本申請研究では、まず、上皮細胞と口腔粘膜細胞由来線維芽細胞を用いて、正常な口腔粘膜組織に類似したin vitroモデル構築を試み、上皮間葉間に基底膜組織が形成されるなど、正常な口腔粘膜組織に類似した組織を形成することに成功した。次に、角化粘膜の間葉組織に高発現する遺伝子の抽出に成功したことから、三次元共培養実験モデルを用いて機能解析を行い、抽出された遺伝子は、上皮細胞3次元培養モデルにおいてのみ角化を促進する結果を得た。このことから、直接上皮細胞に作用し、機能していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然歯や口腔インプラント義歯が長期的に良好な予後を維持するためには、臨床的に健康な歯周組織、なかでも、歯頸部や口腔インプラント周囲に十分な幅の「角化した付着歯肉」が必要であると考えられている。しかし、生来の個体差、さらには歯周病やメカニカルストレスなどにより角化した付着歯肉の幅が不足、喪失することも少なくない。この問題に対して申請研究は、角化歯肉の形質を維持する力を生物学的に理解し、歯槽粘膜を構成する細胞や、未分化な細胞を角化歯肉に生物学的に分化誘導することで、低侵襲な角化歯肉の再生療法の開発を目指し、正常な口腔粘膜組織に類似したin vitroモデル構築に成功したという臨床的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a minimally invasive keratinized gingival tissue acquisition therapy. we first attempted to construct an in vitro model that resembles normal oral mucosal tissue using epithelial cells and oral mucosa cell-derived fibroblasts, and succeeded in forming a basement membrane tissue between the epithelium and mesenchyme, which resembles normal oral mucosal tissue. We succeeded in forming tissue similar to normal oral mucosal tissue, including the formation of basement membrane tissue between the epithelium and mesenchyme.

Next, we succeeded in extracting genes that are highly expressed in the mesenchyme of keratinized mucosa, and performed functional analysis using a three-dimensional co-culture experimental model. The extracted genes promoted keratinization only in the three-dimensional epithelial cell culture model, indicating that the genes act directly on epithelial cells and are functional.

研究分野：補綴歯科学

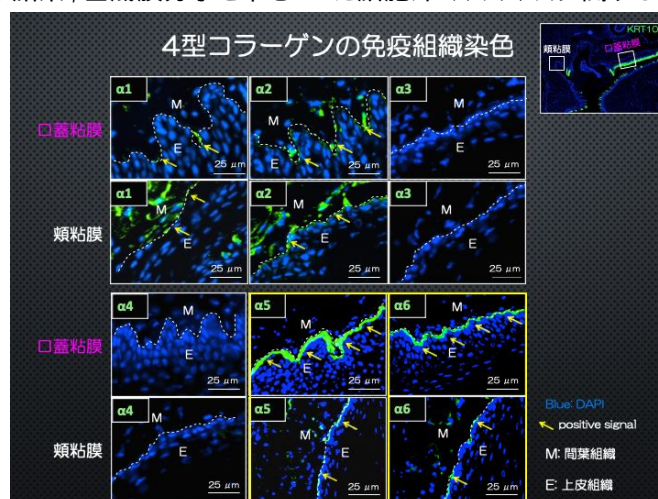
キーワード：角化歯肉 上皮 間葉 基底膜

1. 研究開始当初の背景

天然歯や口腔インプラント義歯が長期的に良好な予後を維持するためには、臨床的に健康な歯周組織、なかでも、歯頸部や口腔インプラント周囲に十分な幅の「角化した付着歯肉」が必要であると考えられている。しかし、生来の個体差、さらには歯周病やメカニカルストレスなどにより角化した付着歯肉の幅が不足、喪失することも少なくない。この問題に対しては、現在、口蓋歯肉から結合組織を含めた角化歯肉を移植する遊離歯肉弁移植術が実施されている。ただし、ドナーサイトを含めた外科的侵襲の大きさや予後が術者の技術に大きく依存するなどから、自己組織移植に依存しない、より低侵襲、簡便かつ確実な付着歯肉獲得法の開発が望まれているが、十分な成果は上がっていない。

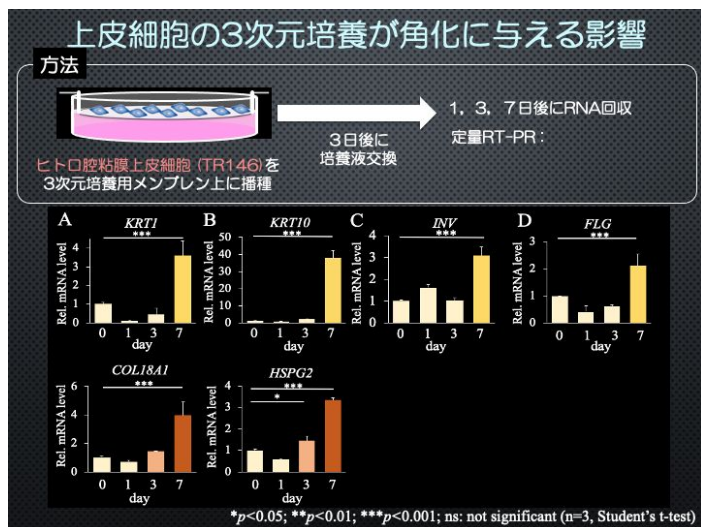
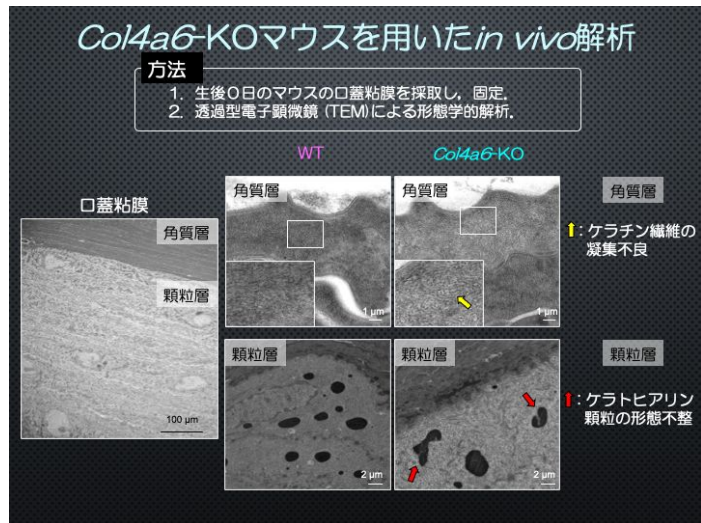
現在の遊離歯肉弁移植術は、「非付着・非角化歯肉部(歯槽粘膜)を半層弁で剥離後、本歯槽粘膜を根尖側に移動し、既存の骨膜を露出させる。その上に、口蓋部から同様に半層弁で結合組織を含めて採取した付着・角化歯肉を移植することによって生着させる」というものである。本術式を生物学的視点で解釈すると、移植部位の骨膜だけを残して創部の治癒を待っても付着・角化歯肉は生まれないことから、口蓋部から採取した結合組織・基底膜・上皮複合体自体に、付着・角化歯肉としての形質を維持する力が備わっていると考えることができる。この形質を維持する力を生物学的に理解し、歯槽粘膜を構成する細胞や、未分化な細胞を付着・角化歯肉に生物学的に分化誘導することができれば、付着・角化歯肉を生物学的に獲得することが可能となると思われる。

そこで、付着・角化歯肉と非付着・非角化歯肉(歯槽粘膜)の違いを明らかにすることを目的に、両組織のcDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、基底膜分子を中心とした細胞外マトリックスに関する遺伝子群に大きな相違があるという結果が得られた。そのため、付着・角化歯肉(以下、角化歯肉)と非付着・非角化歯肉(以下、非角化歯肉)が発現する基底膜分子の相違を明らかにすることを目的に、基底膜に特化した網羅的免疫組織染色を行った。その結果、予想どおり角化歯肉と非角化歯肉の基底膜の発現様式が異なり、角化歯肉には、 $\alpha 1$ 型コラーゲン556, $\alpha 2$ 型コラーゲンが特異的に発現していた。



さらに、*Col4a6*および*Col18a1*の遺伝子欠損マウスの口蓋粘膜を用いた*in vivo*解析の結果、TEM解析より粘膜上皮の形態異常が生じていること、免疫組織染色より角化マーカーであるケラチン(K10)の発現が低下していることが確認された。この特異的基底膜分子・角化上皮細胞コンビネーションはある意味、角化歯肉の運命を得た際の結果であると考えることができ、上皮の角化の運命を決定する因子は別に存在する可能性があることを指し示すことができた(Komori, Maekawa et al, *Scientific Reports*, 2018)。

一方、自己口腔粘膜由来上皮細胞シートは角膜細胞欠損部に移植すると、角膜細胞へと分化することが知られている。また、遊離歯肉弁移植の際には、口蓋より採取した間葉組織の厚みが不十分であると、移植上皮の角化が維持されず、非角化・非付着粘膜へと後戻りすることが知られている。すなわち、移植部位の環境の影響を受けて、移植された口腔粘膜上皮細胞の運命は変化するが、遊離歯肉弁移植術の場合には十分な間葉組織を付けた複合体として移植しているため、付着・角化歯肉が維持されると考えることができる。そこで、角化歯肉および非角化歯肉より採取した間葉細胞と口腔粘膜上皮細胞を共培養してみると、角化歯肉由来間葉細胞と培養した場合にのみ、口腔粘膜上皮細胞の角化が促進され、これまでに明らかにしてきた角化歯肉関連基底膜分子の発現上昇を認めた。つまり、付着・角化歯肉



間葉組織からの生物学的シグナルが上皮細胞に作用し、角化歯肉特異的な基底膜分子の産生を促すことで上皮細胞の角化が促進されていると考えられ、上皮細胞の歯肉角化関連基底膜の発現をコントロールしている間葉細胞からのシグナル分子を同定することが、付着・歯肉角化の制御メカニズムの解明に繋がると考えられる。しかし、この付着・角化歯肉間葉組織からのどのような因子が作用し、制御されているのか、その分子基盤に関してはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

以上の背景より、上皮細胞の角化を誘導し、維持するための特異的な間葉組織由来のシグナル分子を明らかにすることを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

口腔粘膜の間葉組織は、筋肉や脂肪など様々な組織を含むことから、マクロレベルで口蓋粘膜から間葉組織を採取すると、様々な組織を含んでしまい、正確な RNA の発現レベルを知ることができない。そこで、基底膜直下の間葉組織を特異的に採取し、基底膜直下に存在する角化歯肉由来間葉細胞と非角化歯肉由来間葉細胞の遺伝子発現の相違を明らかにすることを目的に、レーザーマイクロダイセクション法と RNA-Seq を組み合わせて候補因子の抽出を行った。具体的には、マウスの口蓋粘膜(角化粘膜)と頬粘膜(非角化粘膜)の凍結組織切片を作製し、サンプルの厚み、固定方法、染色方法、マイクロダイセクション法のレーザーの強度の調整等、様々な条件を検討した。更に、これらのサンプルから RNA を抽出し、RNA の品質評価を行った。

回収した RNA からランダムプライマーを用いた SMART-seq stranded kit を用いて cDNA ライブラリーを作製し、Illumina 社製の Hi-Seq にてシーケンス解析を行った。そして、バイオインフォマティクス解析にて、角化に関わる因子の抽出を試みた。

更に、ヒト口腔扁平上皮癌由来の口腔粘膜上皮細胞である TR146 と、ヒト口腔粘膜細胞由来線維芽細胞を用いた三次元共培養実験モデルを構築すべく、コラーゲンゲルの種類、濃度や細胞の濃度などの条件検討を行った。これらの検討によって構築した三次元共培養実験モデル、および、上皮細胞のみの三次元培養実験モデルを用いて、抽出された因子の機能解析を実施した。

4. 研究成果

凍結組織切片を作製し、サンプルの厚み、固定方法、染色方法、マイクロダイセクション法のレーザーの強度の調整等の条件検討を行った結果、最適な条件を見出すことに成功した。また、この条件で抽出した RNA の質を TapStation (アジレント)を用いて確認した結果、RIN 値は 5 前後であり、RNA-seq ライブラリーを作製するのに十分な品質、量の RNA を回収することができた。

バイオインフォマティクス解析の結果、非角化粘膜と比較し、角化粘膜の間葉組織に高発現する遺伝子 (2 倍以上)が 1138 抽出され、その中に 12 の転写因子が含まれていた。次に、Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いた上流解析より、上皮組織の比較解析と間葉組織の比較解析から、同じ遺伝子が抽出される結果を得た。

次に、ヒト口腔扁平上皮癌由来の口腔粘膜上皮細胞である TR146 と、ヒト口腔粘膜細胞由来線維芽細胞を用いて、正常な口腔粘膜組織に類似した in vitro モデル構築に適正な条件の絞り込みを行い、上皮 間葉間に基底膜組織が形成されるなど、正常な口腔粘膜組織に類似した組織を形成することに成功した。

そこで IPA 解析で抽出された遺伝子が間葉組織に作用し間接的に上皮の角化を誘導しているのか、それとも上皮組織に直接作用して上皮の角化を誘導しているのかを明らかにするため、三次元共培養実験モデル、および、上皮細胞のみの三次元培養実験モデルを用いて機能解析を行った。その結果、今回抽出された遺伝子は、上皮細胞 3 次元培養モデルにおいてのみ角化を促進したことから、直接上皮細胞に作用し、機能していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nguyen HTT, Ono M, Hara ES, Komori T, Edamatsu M, Yonezawa T, Kimura-Ono A, Maekawa K, Kuboki T, Oohashi T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Type XVIII Collagen Modulates Keratohyalin Granule Formation and Keratinization in Oral Mucosa.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E4739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20194739.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nguyen Ha, 大野充昭, 小盛大志, 植田淳二, 前川賢治, 窪木拓男
2. 発表標題 口腔粘膜上皮の角化制御に関わる基底膜分子の同定
3. 学会等名 第50回公益社団法人日本口腔インプラント学会記念学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nguyen HTT, Ono M, Hara ES, Komori T, Edamatsu M, Yonezawa T, Kimura-Ono A, Maekawa K, Kuboki T, Oohashi T.
2. 発表標題 A new function of type XVIII collagen in basement membrane of oral mucosa: a regulator of keratinization.
3. 学会等名 11th International Conference on Proteoglycans (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nguyen HTT, Ono M, Hara ES, Komori T, Edamatsu M, Yonezawa T, Kimura-Ono A, Maekawa K, Kuboki T, Oohashi T.
2. 発表標題 Type XIII collagen modulates keratohyalin granule formation and keratinization in oral mucosa.
3. 学会等名 The 4th International Symposium of Medical and Dental Education in Okayama (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nguyen HTT, Ono M, Hara ES, Komori T, Edamatsu M, Yonezawa T, Kimura-Ono A, Maekawa K, Kuboki T, Oohashi T.
2. 発表標題 Type XVIII collagen modulates oral mucosal keratinization in adult mice.
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR 2020.3.21 Washington DC, USA. (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	窪木 拓男 (KUBOKI Takuo) (00225195)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	富田 秀太 (TOMIDA Shuta) (10372111)	岡山大学・大学病院・准教授 (15301)	
研究分担者	ハラ エミリオ・サトシ (HARA Emilio) (40779443)	岡山大学・医歯薬学域・研究准教授 (15301)	
研究分担者	大橋 俊孝 (OHASHI Toshitaka) (50194262)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	大野 充昭 (ONO Mitsuaki) (60613156)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------