

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592634

研究課題名（和文） 接合上皮細胞の遺伝子発現の網羅的解析と特異的マーカーの検索

研究課題名（英文） Comprehensive gene analysis in junctional epithelium

研究代表者

山本 松男（YAMAMOTO MATSUO）

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50332896

研究成果の概要（和文）：歯周組織の維持のために重要である付着上皮は角化せず、特異的な性質を示す。特徴付ける分子の発現を網羅的に解析したところ、SLPI、S100A8、S100A9、CXCL1、CXCL2 等の自然免疫もしくは自然炎症に関わる分子の発現が確認され、角化する口腔上皮とは異なる性質を有することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Junctional epithelium(JE) is important for the maintenance of periodontal tissues without keratosis, and indicates specific characteristics. Our comprehensive gene expression analysis in JE demonstrated that several molecules concerning innate immunity or homeostatic inflammation such as S100A9, S100A8, CXCL1, CXCL2 and SLPI, has been confirmed. Those result showed that JE has different gene expression pattern from keratinized oral epithelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
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・歯周治療系歯学

キーワード：付着上皮、遺伝子発現、自然免疫、自然炎症、歯周病

1. 研究開始当初の背景

口腔上皮は歯肉溝付近で歯肉溝上皮へと移行し歯面に対して上皮性の付着形式をとるが、歯が上皮を貫通する形で口腔内に存在しているために、人体で唯一、上皮の連続性の損なわれた特殊な構造を持っている。歯面へ付着する部位は接合上皮と呼ばれるが、絶えず口腔内微生物の侵入とのせめぎ合いが生じている。歯周病では歯肉溝付近に付着したデンタルプラークが主な原因となって炎症が生じ、接合上皮部分では細胞間接着のゆ

るみや好中球の浸潤、上皮の剥離が生じる。つまり、歯周病は接合上皮（上皮性付着）の破壊からはじまるといえる。口腔粘膜上皮とは異なり、接合上皮では角化や錯角化がほとんどみられず、活発な分裂と物質透過、細胞通過など、特有な点が多数存在する。また、細菌や菌体成分、細菌産生物の組織内への侵入を伴い、やがて接合上皮部分に炎症が生じると、上皮直下の結合組織中の血管より栄養物質、免疫関連物質などの物質の透過が亢進し、また好中球がより多く遊走することが知ら

られている。

しかし、これまでは硬組織に隣接する細胞数の大変少ない組織なために接合上皮細胞の同定と分離は容易ではなく、形態学的な研究が主であり、分子生物学的な解析が十分ではなく、特徴的な遺伝子発現も特徴的なマーカーも確認されていない。また、接合上皮細胞を代表する培養細胞株も確立されていない。今後は分子生物学的手法に基づくより詳細なメカニズムの解明が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病病変の初期に破壊の進む上皮性付着機構に着目し、上皮付着で発現する分子を凍結切片から顕微鏡下でレーザーによりきりだし分子レベルで解明することによって、その分子機構を網羅的に解析することである。

3. 研究の方法

7週齢までの Jcl:ICR マウス頭部を凍結薄切（前頭断）の後、レーザーダイセクション法によって接合上皮部分に含まれる細胞群を分離する方法を確立し（平成 22 年度）、接合上皮で特に発現の高いと思われる遺伝子について、発現レベル、タンパク質の発現分布などについて解析を行った。

4. 研究成果

抽出した遺伝子から cDNA ライブラリを構築し、その中から SLPI（分泌型好中球プロテアーゼインヒビター）が、付着上皮において発現の高いことを見いだした。メッセージレベルで 30 倍超高く、免疫組織学的染色法によりタンパク質レベルでも付着上皮部位において発現していることが確認された（Journal of Periodontal Research に印刷公表をした）。平成 23 年度では、口腔内の常在菌の存在の有無による生体の反応性の差異にも着目し解析を進めた。その結果、抗菌作用を持つペプチドとして知られているカルプロテクチンを構成する S100A8 および S100A9 が、付着歯肉では高く発現していることが明らかになった。元々感染防御に機能することが知られているタンパクであり、好中球での発現がよく知られている。歯肉溝滲出液でもカルプロテクチンの存在が知られていたが、その由来は好中球であろうと予想されていたもののそれ以外の組織での発現についての報告は皆無であった。免疫組織学的染色法により、タンパクレベルでの発現についても確認をすることができた（現在投稿・リバイス中）。また、好中球の浸潤に着目して発現物質の解析を行ったところ、MIP-2/CXCL2 および KC/CXCL1 の発現が

確認され、これらは微生物の存在しない環境で飼育されるマウスで発現レベルが低いことから、組織の恒常性を維持するため（常在菌等の侵入を防ぐ等）に付着上皮で発現しているものと結論した。

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 8 件）

- ① Murayama R, Kobayashi M, Takeshita A, Yasui T, Yamamoto M, MAPKs, activator protein-1 and nuclear factor- κ B mediate production of interleukin-1 β -stimulated cytokines, prostaglandin E(2) and MMP-1 in human periodontal ligament cells, J Periodontal Res, 査読有, vol. 46, No. 5, 2011, 568-575
- ② 臼井通彦, 滝口 尚, 史 春, Guruudivaa E, 宮澤 康, 菅野真莉加, 野瀬冬樹, 斎藤彰大, 菊池真理子, 富永和宏, 西原達次, 根岸洋一, 山本松男, 超音波照射のヒト歯肉上皮細胞に対する影響について、日歯保存誌、査読有、54 巻 6 号、2011、424-431
- ③ Tsukamoto Y, Usui M, Yamamoto G, Takagi Y, Tachikawa T, Yamamoto M, Nakamura M, The role of junctional epithelium periodontal innate defense and homeostasis, J Periodontal Res, 査読有、2012、in press
- ④ Hayashi Y, Matsunaga T, Yamamoto G, Nishii K, Usui M, Yamamoto M, Tachikawa T, Comprehensive analysis of gene expression in the junctional epithelium by laser microdissection and microarray analysis, J Periodont Res, 査読有, Vol. 45, No. 5, 2010, 618-625
- ⑤ Suzuki K, Sakiyama Y, Usui M, Obama T, Kato R, Itabe H, Yamamoto M, Oxidized low-density lipoproteins increases IL-8 production in human gingival epithelial cell line Ca9-22, J Periodont Res, 査読有, Vol. 45, No. 4, 2010, 488-495
- ⑥ 臼井通彦, 山本松男, 歯周病が全身に及ぼす影響、月刊糖尿病、査読無、2 巻、13 号、2010、15-20
- ⑦ 臼井通彦, 山本松男, 歯周病と全身疾患リスクは？、肥満と糖尿病、査読無、9 巻、5 号、2010、752-753
- ⑧ Suzuki K, Yamamoto M, Itabe H 他 3 名, Docosahexaenoic acid induces adipose differentiation-related protein through activation of

retinoid X receptor in human choriocarcinoma BeWo cells、
Biol. Pharm. Bull、査読有、Vol. 32、2009、
1177-82

〔学会発表〕(計 6 件)

- ① Suzuki K, Sakiyama Y, Nagahama Y, Usui M, Yamamoto M、Oxidized LDL enhances IL-8 production in gingival epithelial cell、The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology、2010. Nov. 01、Honolulu
- ② 山本松男、史 春、臼井通彦、滝口 尚、菅野真莉加、野瀬冬樹、根岸洋一、富永和宏、西原達次、超音波照射の歯肉上皮細胞に対する影響について、日本歯科保存学会 2010 年度秋季学術大会 (第 133 回)、2010 年 10 月 28 日、岐阜
- ③ 島田給里、片岡嗣雄、福羅勝久、柴田健一郎、山本松男、五十嵐武、Naringenin は黄色ブドウ球菌の TLR2 を介した炎症応答を抑制する、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 27 日、横浜
- ④ 向原 正、有本隆文、谷口 誠、高橋真和、山本松男、五十嵐武、Streptococcus mutans の食食抵抗性におけるリポ蛋白質 PPIA の役割、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 27 日、横浜
- ⑤ 臼井通彦、宮園あがさ、山本松男、リゾリン脂質・LPA (lysophosphatidic acid) の破骨細胞前駆細胞株 Raw264.7 に対する影響、第 46 回日本口腔組織培養学会学術大会、2009 年 12 月 5 日、東京
- ⑥ 宮園あがさ、須澤徹夫、山本松男、上條竜太郎、エナメル芽細胞における Caspase-14 の役割、第 51 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2009 年 9 月 11 日、新潟

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 松男 (YAMAMOTO MATSUO)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：50335896

(2) 研究分担者

山本 剛 (YAMAMOTO GOU)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：80384189

臼井 通彦 (USUI MICHIHIKO)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：10453630

(3) 連携研究者

()

研究者番号：