

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09921

研究課題名(和文) 歯周組織構成細胞による細胞間相互作用関連因子の同定と歯周病治療への応用

研究課題名(英文) Clinical application and Identification of intercellular relation factors by periodontal tissue cells

研究代表者

中山 洋平 (NAKAYAMA, Yohei)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：30434088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 歯肉上皮細胞、セメント芽細胞および歯根膜線維芽細胞の細胞から得られた Conditional medium (以下CM) を用いて、歯肉接合上皮の恒常性維持に関する細胞間相互作用に関わるマーカー遺伝子の発現変化とそのシグナリングを解析した。

セメント芽細胞および歯根膜線維芽細胞から得たCMをそれぞれ48時間、歯肉上皮細胞に作用させると、歯肉接合上皮特異的遺伝子であるAmtn, Lam 3およびFDC-SP 発現が増加した。マイクロアレイの結果から、これらの作用には、SOCS3, JAK2およびSOD2のシグナリングが関与した。

これらの結果は、歯肉接合上皮が歯面側の組織より調節される可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症などの体外刺激に対して、歯肉接合上皮は歯面接着機構の恒常性を維持し、アメロチンなどの接合上皮特異的遺伝子レベルが変化することは今までに報告した。歯周治療の際には、由来も性質も異なるセメント質、歯根膜および結合組織が協調して歯周組織が再構築していくが、これら互いに近接する歯周組織間の細胞間相互作用の有無は不明であった。過去の動物を使用した研究論文で、歯牙全周の歯肉切除後に回復した歯肉上皮は、本来の歯肉接合上皮とは異なる遺伝子発現パターンを示し、歯肉結合組織内の未分化慣用細胞が関与することが示唆されていた。

今回の結果は、歯面側からの歯肉接合上皮の調節機構の存在の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)： Conditional medium (CM) obtained from gingival epithelial cells, cementoblasts, and periodontal ligament fibroblasts was used to analyze the marker genes expressions involved in intracellular interactions related to the maintenance of homeostasis in gingival junctional epithelium and their signaling.

When CM obtained from cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts was applied to gingival epithelial cells for 48 hours, respectively, the expression of the gingival epithelial-specific genes Amtn, Lam 3 and FDC-SP increased. The results of the DNA microarray showed that the signaling of SOCS3, JAK2 and SOD2 was involved in these effects.

研究分野：歯周病学

キーワード：細胞間相互作用 歯肉接合上皮 アメロチン FDC-SP

1. 研究開始当初の背景

歯肉接合上皮(JE)は、生物学的幅径の上皮性付着を構成する部位であり、外部刺激からの防御という役割がある反面、歯周組織再生療法においては、他の歯周組織構成細胞による再生の足場を阻害する存在である。すなわち、歯周病重症化予防の点では維持・促進、再生療法時には抑制されるべき2面性をもって調節されるべき組織である。しかし、JEと他の歯周組織との相互作用はほとんど研究されていない。我々は、JEに発現する遺伝子(アメロチン(AMTN)、ODAM、FDC-SP)タンパク質の遺伝子発現調節機構を解析してきた。これらのタンパク質はお互いに結合し、JEを構成する。今までに様々な病態を想定し、慢性歯周炎、歯肉増殖症、アポシスおよび腫瘍や創傷治癒で認められる上皮間葉移行(EMT)において、これらの遺伝子発現が増加することを報告してきた。さらに、セメント芽細胞および歯根膜線維芽細胞と歯肉上皮細胞との共培養で生成された代謝産物が、接合上皮特異的遺伝子の発現を減少させることを明らかにした。これらの見解は、細胞の増殖・分化・機能発現などの生命活動は、細胞周囲の微小環境にある液性因子や細胞-細胞間相互作用、細胞-細胞外マトリックス間相互作用が重要であることを示している。しかし、歯周組織の再生に重要であるセメント芽細胞および歯根膜細胞と、歯肉上皮細胞の相互的な変化とそれに関連する因子は明らかではない。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、歯肉上皮細胞、セメント芽細胞および歯根膜線維芽細胞および歯肉線維芽細胞の3種の単独培養によって得られたConditional medium(CM)を用いて、歯肉接合上皮に特異的に発現する遺伝子群の変化を検索し、それに関わるシグナリングと液性因子を同定することである。それらのデータを元に、歯周組織構成細胞の相互作用で必然的に生成される歯周組織再生能に関わる液性因子を同定し、効率の良い歯周組織再生療法への応用へ向けた基礎的データを収集することでできると考えた。

3. 研究の方法

細胞培養—ヒト歯肉上皮細胞(TIGKs-hTERT)の培養には、Keratinocyte Growth Kit(ATCC)、1%PC・ST含有、Dermal Cell Basal Medium培地(ATCC)を用いた。ヒトセメント芽細胞(HCEM-hTERT)およびヒト歯根膜細胞(HPL-hTERT)には、1%FCS、1%PC・ST含有、MEM- α 培地(GIBCO)を使用した。

Conditional mediumの作製—上記の3種の細胞をそれぞれ60mm dishに播種し、70%コンフルエントになった後、それぞれの無血清培地に交換し、72時間培養した。その後、培養液をフィルターに通して回収し、Conditional medium(TIGKs-CM、T-CM; HCEM-CM、C-CM; HPL-CM、P-CM)とした。

RNA抽出—TIGKsを60mm dishに播種し、70%コンフルエントになった後、T-CM、C-CMおよびP-CMを48時間作用させ、細胞を回収した。回収した細胞から全RNAをRNA抽出キット(ISOGEN[®])にて抽出した。

Real-time PCR—抽出した全RNAをExScript RT reagent kitを用いて、cDNAを合成した。cDNAをSYBR Green qPCR Kitを用いて、Real-time PCRを行った。プライマーには歯肉接合上皮のマーカであるアメロチン(Amtn)、FDC-SPおよびラミニン β 3(Lam β 3)、基底膜マーカであるCol4を用いた。

DNAマイクロアレイ—T-CM、C-CMおよびP-CMを48時間作用させたTIGKsからRNA抽出した。GeneChip Expression Array(TaKaRa)を使用し、T-CM刺激をコントロールとしてC-CMおよびP-CMで2倍以上増加した遺伝子をプロファイリングした。さらにWiki pathwayにて関連する細胞内情報伝達系を検索した。

蛍光多重免疫染色法(Immunofluorescence, ICC)—TIGKsをCultureSlideに播種した後、T-CM、C-CMおよびP-CMを48時間作用させ、歯肉接合上皮特異的遺伝子とC-CMによる細胞内情報伝達系に関わる因子のタンパク質発現レベルと局在を確認した。細胞をPFAで固定後、0.5% Triton[®]X-100で透過処理した。1%BSAで20分ブロッキングした。1次抗体および2次抗体は室温で1時間それぞれ作用させた。2次抗体は室温で40分間反応させた。LSM 5 EXCITER(Carl Zeiss)でイメージングした。1次抗体にはAMTN、FDC-SP、Lam5、細胞増殖マーカであるKi67を使用した。

4. 研究成果

セメント芽細胞培養液を歯肉上皮細胞に48時間作用させると、歯肉接合上皮特異的遺伝子であるAMTN、FDC-SPおよびLam5のmRNAレベルおよびタンパク質発現量が増加した(図1)。その変化に関連する遺伝子を網羅的にDNAマイクロアレイで解析した結果、595遺伝子が2倍以上増加、820遺伝子が2倍以上減少した。その中で、細胞内情報伝達系は56、2倍以上減少した遺伝子を含む細胞内情報伝達系は112であった。Wiki pathwayでさらに有意差のあった遺伝子群に絞り込むと、JAK/STAT signaling pathway、Sphingolipid pathway、Ras signaling および VEGFA-

VEGFR2 signaling pathway が関連することが示唆され、Real-time PCR および ICC にて RNA レベルおよびタンパク質発現レベルでの変化を確認した(図2)。

同様に、歯根膜線維芽細胞培養液を歯肉上皮細胞に作用させた後、DNA マイクロアレイで解析した結果、564 遺伝子が 2 倍以上増加、1210 遺伝子が 2 倍以上減少した。その中から、関連する細胞内情報伝達系を抽出し、Wiki pathway で有意差のあった遺伝子群に絞り込むと、EGF/EGFR signaling pathway、JAK/STAT pathway、NRF2 pathway および Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) pathway が関連することが示唆された。しかし、それぞれの情報伝達系に関連する遺伝子群の発現レベルや相互作用について詳細を解析する必要がある。

また、TIGS 細胞では、歯肉接合上皮特異的遺伝子の1つである ODAM の発現量が小さく、細胞間相互作用による ODAM 遺伝子発現の変化は解析できなかった。ODAM は AMTN、FDC-SP 同様に炎症時に、炎症性サイトカインであるインターロイキン 6 (IL6) やインターフェロン γ によって発現量が増加することが明らかになった。ODAM 遺伝子ノックアウトマウスは、歯肉退縮を起こしやすく、歯肉接合上皮の歯面接着機構に深く関わることを報告され、ODAM と AMTN、FDC-SP は結合して歯肉接合上皮に局在することからも、その関連性は解析が必要である。

これらの結果から、セメント質に存在するセメント芽細胞からの液性因子によって、歯肉上皮細胞中の遺伝子調節機構が存在する可能性が示された。しかし、今回関連づけた細胞内情報伝達系に参与する液性因子がセメント芽細胞から放出されているかはまだ不明である。今後の研究では、歯根膜線維芽細胞による歯肉上皮細胞調節機構の解析を進めると同時に、セメント芽細胞および歯根膜線維芽細胞から放出されるエクソソーム中の液性因子の同定を行い、今回の解析で得た関連細胞内情報伝達系との関連性を解析する予定である。

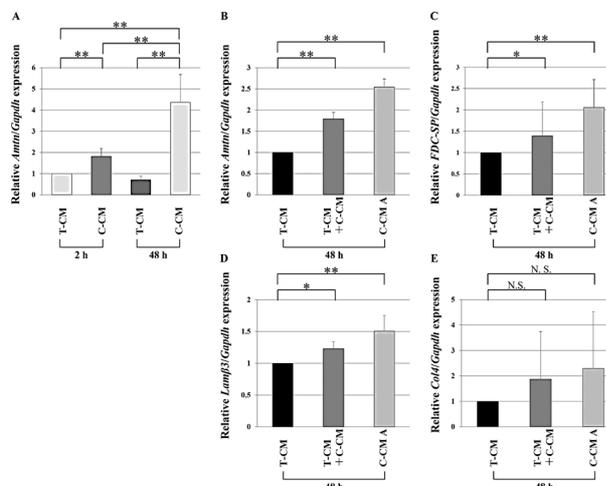


図1 Real-time PCR

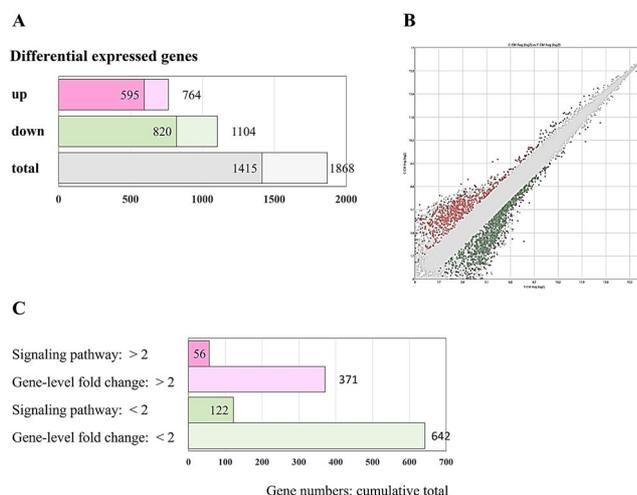


図2 DNA マイクロアレイ (T-CM VS C-CM)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金 振宇, 山口 亜利彩, 五十嵐 一, 山崎 瑞穂, 高井 英樹, 中山 洋平, 小方 頼昌
2. 発表標題 MiR-200bはヒト歯肉上皮細胞におけるTNF- 誘導ODAM遺伝子発現を抑制する
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 五十嵐一馬, 山口亜利彩, 金 振宇, 高井瑞穂, 高井英樹, 中山洋平, 小方頼昌
2. 発表標題 Follicular dendric cell-secreted protein遺伝子発現に対するinterferon- の影響
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山洋平, 五十嵐一馬, 金 振宇, 山口亜利彩, 鶴屋祐人, 高井瑞穂, 小方頼昌
2. 発表標題 ヒト不死化セメント芽細胞コンディショナルメディウムによる歯肉接合上皮特異的遺伝子の発現調節
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鶴屋祐人, 五十嵐一馬, 金 振宇, 山口亜利彩, 高井瑞穂, 高井英樹, 中山洋平, 小方頼昌
2. 発表標題 C/EBPおよびYY1を介した炎症性サイトカインによるODAM遺伝子の転写調節
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金 振宇, 鶴屋祐人, 山口亜利彩, 五十嵐一馬, 高井瑞穂, 高井英樹, 中山洋平, 小方頼昌
2. 発表標題 IL-6によるヒトODAM遺伝子の転写調節機構の解析
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴屋祐人, 山口亜利彩, 高井瑞穂, 目澤 優, 高井英樹, 中山洋平, 小方頼昌
2. 発表標題 ヒトODAM転写調節に対するIL- の影響
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴屋祐人, 山口亜利彩, 金振宇, 高井瑞穂, 目澤優, 高井英樹, 中山洋平, 小方頼昌
2. 発表標題 ODAM 遺伝子発現に対する IL-1 の影響
3. 学会等名 第21回 日本大学口腔科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuto Tsuruya, Arisa Yamaguchi, Mizuho Takai, Masaru Mezawa, Hideki Takai, Yohei Nakayama, Yorimasa Ogata
2. 発表標題 Transcriptional regulation of human ODAM gene by tumor necrosis factor-
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 99th General Session and Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴屋祐人, 山口亜利彩, 高井瑞穂, 目澤 優, 高井英樹, 中山洋平, 小方頼昌
2. 発表標題 FDC-SP遺伝子発現に対するIL-6の影響
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021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	小方 頼昌 (OGATA Yorimasa) (90204065)	日本大学・松戸歯学部・教授 (32665)	

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
---------	---------