

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592968

研究課題名(和文)インプラント周囲上皮の口腔粘膜疾患に対するリスク評価法の確立

研究課題名(英文)Establishment of Risk Measurement for Peri-implant Mucosal Disease

## 研究代表者

矢島 安朝 (Yajima, Yasutomo)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10183667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜の貫通からなるインプラント周囲組織(PSIT)は、慢性的に炎症を伴っていることから、口腔粘膜疾患を発症する危険性が高いと考えられる。本研究は、口腔粘膜組織(OMT)と比較したPISTの特異的遺伝子を特定し、腫瘍発現の関連性を明らかとすることを目的とした。ラットのPISTとOMTを試料として用い、マイクロアレイ法により3個の特異的遺伝子：Ceacam1、Ifitm1、Muc4を抽出した。Ceacam1は、免疫防御機構に関与、Ifitm1やMuc4は腫瘍発現に関与することが報告されている。よって、本研究で同定された遺伝子の発現がインプラント周囲上皮の口腔粘膜疾患発症に関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Peri-implant soft tissue (PIST) was created by implant placement with epithelial penetration and known to have chronic inflammation. Therefore, we hypothesized PIST had risk factors for mucosal disease including oral carcinoma. The aim of this study was to determine specific genes in PIST to compare comprehensive gene expression between PIST and oral mucosal tissue (OMT) using microarray analysis and to clarify the relationship with oncogenesis. The rattus PIST and OMT were used for samples and three specific gene; Ceacam1, Ifitm1, Muc4 were determined by microarray analysis Gene Ontology term. Cecam1 was reported to have defensive role by polymorphonuclear leukocytes activation. Moreover, high expression of Ifitm1 and Muc4 was known to relate the oncogenesis. From these results, three specific gene expression in PIST have a possibility to influence the oral mucosal diseases.

研究分野：再生医学

キーワード：インプラント インプラント周囲上皮 インプラント周囲軟組織 遺伝子発現 マイクロアレイ法

### 1. 研究開始当初の背景

近年、インプラント治療は高い成功率を示し、欠損補綴法の一つとして広く用いられている。一方で、超高齢社会を迎えたわが国では、インプラント治療を希望する患者の年齢層においても高齢化していくことが予想される。このことから、加齢に伴う全身的な機能低下や内分泌障害などによる骨粗鬆症、糖尿病、高血圧症などの様々な合併症が増加していくなかで、口腔領域においては悪性腫瘍である口腔癌の発症が問題となってくる。口腔癌は他の臓器と比較して、刺激や発癌物質に暴露しやすい組織であり、臓器全体が遺伝子的に不安定となり異常増殖をきたしやすい状態となっている「Field Cancerization」という概念が提唱されている。さらに他臓器の癌と比較すると高年齢で発症することがよく知られている。申請者らのインプラント治療患者の年齢別割合の統計においても、男性が60歳代、女性が50歳代にピークが認められた。(図1)

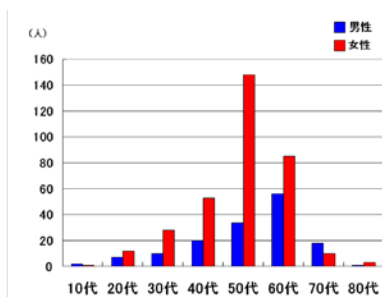


図1. インプラント患者の年齢別割合

このことから、高齢患者が多いインプラント治療においては口腔粘膜疾患、口腔癌の発症を考慮していく必要があると考えられる。

また、インプラント治療ではインプラント体の埋入により形成される粘膜貫通部は、上皮のバリアが破壊され、天然歯と比較して脆細胞接着機構が脆弱であり、細菌や外来刺激に対する防御機構が劣っていることから、慢性的な炎症を伴いやすい組織であることが知られている。このことから、インプラント周囲組織内の慢性炎症などによる影響が遺伝子を不安定にし、より発癌のリスクを増加させることが考えられる。また実際に、インプラント治療と口腔癌に関連する臨床症例報告がなされている<sup>①-⑥</sup>。

今後、インプラント治療の高齢化さらには使用期間の長期化によって、インプラント周囲組織に対する影響は、インプラント周囲炎等だけでなく、口腔癌を含む粘膜疾患の発症も増加していくことが予想される。しかしながら従来の研究では、インプラント周囲組織の病理組織学的な検討やインプラント周囲炎のリスクに関する報告は、数多く報告されているものの口腔粘膜への影響や粘膜疾患の発症に観点をおいた研究はなされていない。

そこで申請者らは、口腔粘膜組織はインプラント治療によって口腔癌を含む口腔粘膜疾患発症のリスクが高くなると仮説をたて、

口腔粘膜組織からインプラント周囲組織との遺伝子発現を比較検討し、特異マーカーを同定することでインプラント周囲組織由来の口腔粘膜疾患を早期に診断・評価できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、インプラント治療に伴う口腔粘膜疾患へのリスク評価法を確立することを目的として、①口腔粘膜上皮とインプラント周囲上皮間における網羅的な遺伝子発現を比較検討し、遺伝子発現プロファイルを作成し、特異マーカーとなる遺伝子を同定②4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) 投与による口腔癌の自然発癌モデルを用いて、同定された遺伝子の発現を比較・検討を行う。

本研究の成果を起点としてインプラント治療に伴う口腔粘膜疾患へのリスク評価法が確立されれば、将来的に増加していくと考えられるインプラント周囲上皮由来の口腔粘膜疾患の発症を予測し、回避もしくは早期発見・治療へとつながり、より安全で長期に使用が可能となるインプラント治療が提供できるものとする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物実験

実験には4週齢の雄性SD系ラットを使用した。ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与による全身麻酔下に両側第一臼歯を抜歯し、左側にはチタン合金製インプラント (Ti-6Al-7Nb、直径: 1.55mm、長さ: 4mm) を埋入した (図2)。本動物実験は、東京歯科大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。



図2. インプラント埋入4週間後の口腔内写真

#### (2) サンプルの採取

インプラント埋入4週間後に①実験群: 左側インプラント周囲組織 (PIST) と②対照群: 右側第一臼歯部口腔粘膜組織 (OMT) を実体顕微鏡下 (SZ61: OLYMPUS) に採取後、迅速に組織用 RNA 固定液 (RNAlater solution: Applied biosystems) に浸漬し、タングステンカーバイド製ビーズを用いてホモジナイズを行った。RNAeasy mini kit (QIAGEN) による RNA 抽出後に量 (ND-100: NanoDrop) と質 (Agilent 2100 Bioanalyzer: Agilent) の確認を行い、基準を満たしたサンプルのみを使用した。

### (3) マイクロアレイ解析

total RNA から GeneChip 3<sup>′</sup> IVT press kit (Affymetrix) を用いて cDNA の合成を行った。その後、GeneChip Fluidics station 450 (Affymetrix) を用いて GeneChip (Rat genome 430 2.0 array) と Hybridization し、GeneChip scanner 3,000 (Affymetrix) にてスキャンを行った。これらのデータから遺伝子発現解析ソフト GeneSprints GX ver. 12 (Agilent) を用いて、PIST と OMT における網羅的な遺伝子発現を比較検討した (図 3)。

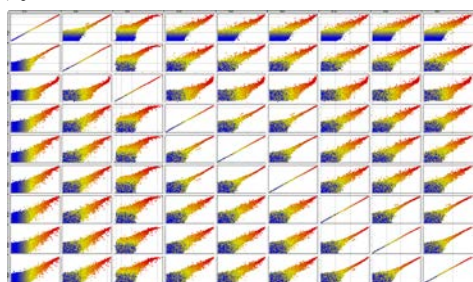


図 3. 各群間における遺伝子発現の網羅的解析

### (4) インプラント周囲組織における特異的遺伝子発現の抽出と発現差の定量

OMT と比較して PIST で発現上昇していた遺伝子群から既知遺伝子に設定された語彙 Gene Ontology (GO) を用いて分け分け、興味深い遺伝子を抽出し、定量的 RT-PCR 法にて発現差の定量ならびに確認を行った。定量的 RT-PCR 法は、選定した 5 遺伝子の Primer + Taqman probe と total RNA を ABI 7500 Fast Prism Sequence Detection System (Applied biosystems) を用いて反応させ、OMT を基準とした  $\Delta\Delta CT$  法による遺伝子発現の定量を行った。

### (5) 免疫組織化学染色

定量的 RT-PCR 法によって発現差が認められた遺伝子群より 3 遺伝子: Ceacam1、Ifitm1、Muc4 を抽出し、タンパクレベルの発現と局在の検討をするため免疫組織化学蛍光染色を行った。インプラント埋入 4 週後のサンプルから通法でパラフィン切片を作製した。切片をクエン酸ナトリウムにて賦活化、3% BSA にてブロッキングを行った後に一次抗体を 4°C で一晩インキュベートした。各一次抗体に対応した二次抗体として Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)、核染色として DAPI (Invitrogen) を用いた二重染色を行い万能顕微鏡 (Axiophoto2, CarlZeiss) を用いて観察を行った。

### (6) 自然発癌モデルラットの作成

タンパクレベルでインプラント周囲上皮に特異的に発現、局在が確認された 3 種 (Ceacam1、Ifitm1、Muc4) が口腔癌発症過程において、どのように発現変化をしていくのかを明らかにするために、発癌剤 (4-NQO) 投与による自然発癌モデルラットの

作成を行った。4 週齢の雄性 SD 系ラットに対し第一臼歯抜歯後にインプラントを即時埋入し、その直後から片倉ら (日本口腔外科学会誌 32 1986) の方法に準じて 4-NQO 1.0g をエチルアルコール 50ml と蒸留水 4950ml にて完全融解させた溶液を、水道水で 50ppm (0.005%) となるよう希釈し、飲料水として投与した。投与 12 週後、24 週後、48 週間後に定量的 RT-PCR 法用に total RNA 抽出、免疫組織化学染色用にパラフィン切片作成の為のサンプル採取を行った。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロアレイ解析による発現差が認められた遺伝子群の抽出

インプラント周囲組織 (PIST) と口腔粘膜組織 (OMT) のマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現の比較検討を行った (図 4)。発現差 Fold 値 2.0 以上の発現差が認められた遺伝子群のうち、OMT と比較して PIST で Up-regulate した遺伝子は 750 個、Down-regulate した遺伝子は 352 個、合計で 1102 個の遺伝子の発現変化が認められた。

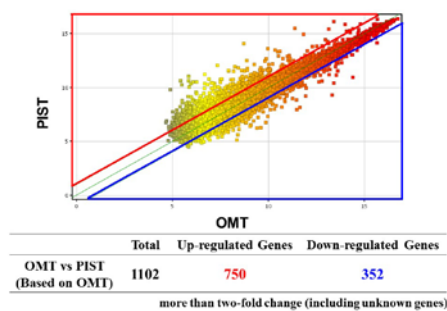


図 4. Fold 値 2.0 以上の発現差がみられた遺伝子群

### (2) Gene Ontology (GO) 解析

PIST で Up-regulate した 750 個の遺伝子群を対象に、既知遺伝子に設定された語彙 GO を用いて解析を行った。3 大 GO における割合は、“Molecular Function”、“Cellular Component”と比較して、“Biological Process”が 49.1% と最も多い割合を示した。(図 5)

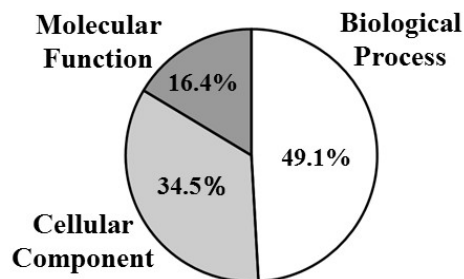


図 5. PIST で Up-regulate した遺伝子群における 3 大 GO の割合

さらに“Biological Process”における下流 GO の割合は“Response to Stimulus”、“Biological Regulation”、“Biological



Regulation”の順で多いことが明らかとなった(表1)。

GO Term	Percentage
Response to Stimulus	19.7%
Biological Regulation	17.5%
Cellular Process	17.0%
Signaling	10.3%
Immune System Process	9.3%

表1. GO: Biological Process の上位5 GO term

これらの結果より、“Response to Stimulus”に関連する遺伝子に注目し、発現差 Fold 値 8.0 以上の 15 遺伝子群(表2)から5遺伝子: *Ceacam1*, *I1b1*, *Ifitm1*, *Muc4*, *Cd74* を抽出した。

Gene Symbol	Probe Set ID	Fold Change
<i>Ceacam1</i>	1370371_a_at	28.3
<i>Sectm1b</i>	1376976_at	22.2
<i>Cfi</i>	1368205_at	21.3
<i>Ccl3</i>	1369815_at	19.5
<i>I1b1</i>	1398256_at	13.2
<i>Ifitm1</i>	1372013_at	12.8
<i>Serping1</i>	1372254_at	11.2
<i>Cxcl2</i>	1368760_at	10.8
<i>Csf3</i>	1369529_at	10.6
<i>Aldh1a7</i>	1368718_at	10.2
<i>Muc4</i>	1370926_at	9.7
<i>Sstr2</i>	1368782_at	9.1
<i>Rac2</i>	1372404_at	9.1
<i>Cd74</i>	1367679_at	8.9
<i>Plek</i>	1390687_at	8.5

表2. Fold 値 8.0 以上で GO: Response to Stimulus に関連する遺伝子群

### (3) 定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現差の確認と定量

抽出した5遺伝子: *Ceacam1*, *I1b1*, *Ifitm1*, *Muc4*, *Cd74* の PIST と OMT の遺伝子発現差を定量的 RT-PCR 法にて確認を行った。5 遺伝子いずれもマイクロアレイ法の結果と同様の発現傾向を示し、OMT と比較して PIST で有為に ( $P < 0.01$ ) 発現上昇していることが確認された(図6)。これらの結果から、既知遺伝子として他臓器での発現、腫瘍発生等に関連が知られている *Ceacam1*, *Ifitm1*, *Muc4* を抽出した。

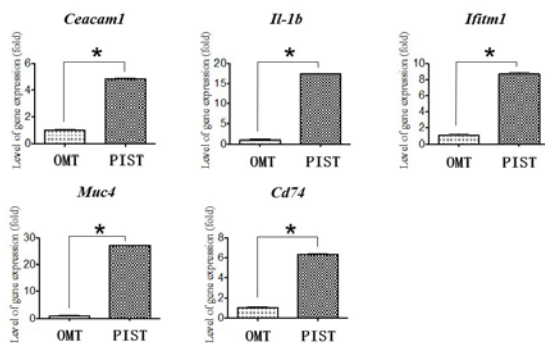


図6. 抽出した5遺伝子の定量的 RT-PCR 法による発現確認と定量 (\*:  $P < 0.01$ )

### (4) 免疫組織化学染色

抽出した3遺伝子: *Ceacam1*, *Ifitm1*, *Muc4* のタンパクレベルでの発現・局在を検討するために、免疫組織化学染色を行った(図7; 上段が PIST 群・下段が OMT 群)。

*CEACAM1* では、インプラント周囲上皮の非角化部位に強い陽性反応(矢印)と上皮下結合組織にも中等度の陽性反応がみられた。

*IFITM1* では、インプラント周囲上皮の非角化上皮部位の顆粒細胞から棘細胞層に中等度の陽性反応(矢印)がみられた。

*MUC4* では、インプラント周囲上皮の非角化細胞部位の表層に強い陽性反応(矢印)がみられた。

一方、対照群である OMT では、*CEACAM1*, *IFITM1*, *MUC4* いずれも反応は認められなかった。

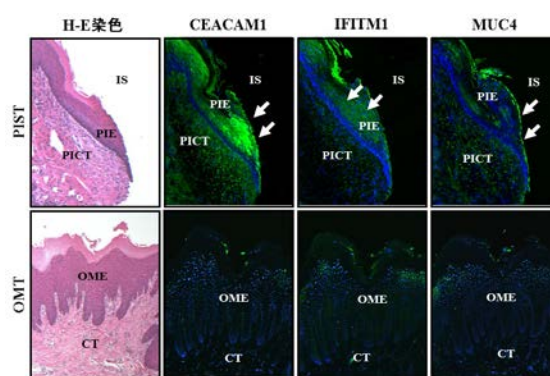


図7. 抽出した3遺伝子の免疫組織化学染色(緑色; 標的タンパク・青色; 核)

### (5) インプラント周囲粘膜発癌モデルにおける3遺伝子の発現評価

インプラント埋入を行ったラットに 4-NQO 投与しインプラント周囲粘膜発癌モデルの作成を行った。投与後 12 週例以降では肉眼的に口蓋中央部にはびらん型の病変を認められたが、病理組織標本では軽度の細胞異型が認められるものの明らかな扁平上皮癌を呈する病理像は認められなかった。また、さらに長期経過例(24~48 週例)では、4-NQO による個体の死亡ならびにインプラントの脱落が生じたため、評価するのに十分なサンプル数の確保が行えなかった。現在、より生存率の高いインプラントの埋入部位や 4-NQO の投与方法を検討ならびに病巣部のみを採取する Laser Microdissection 法の確立を継続的に行っており、評価に十分なサンプル数の確保と特定した3遺伝子の経時的な発現変化についての検討を継続して行っている。

### 5. まとめ

本研究では、ゲノムレベルでの遺伝子発現差を比較・検討を可能とするマイクロアレイ法を用いて、インプラント周囲組織と口腔粘膜組織における網羅的な遺伝子発現解析を行い、1000 個以上の遺伝子が発現変化をしていることを明らかにした。また、これらの遺伝子群は、Down-regulate した遺伝子が 352

個であったのに対して、Up-regulate した遺伝子が 750 個と多い傾向を示したことから、粘膜貫通部の形成により慢性的な刺激や炎症を伴うインプラント周囲組織の形勢によって様々な遺伝子が恒常性の維持や病態発現に起因している可能性が示唆された。

また、GO 解析によって抽出された既知遺伝子群から *Ceacam1*、*Ifitm1*、*Muc4* の 3 遺伝子をインプラント周囲組織に発現する特異的遺伝子として抽出し、定量的 RT-PCR 法による有為な遺伝子発現の上昇と免疫組織化学染色によるタンパクレベルでのインプラント周囲上皮における局在発現を明らかにした。

*Ceacam1* は免疫グロブリンスーパーファミリー、癌胎児性抗原ファミリーに属する糖タンパク質であり、天然歯の付着上皮と歯肉溝上皮にも特異的に発現していることが知られている。機能としては、好中球を活性化させることによる免疫防御機構に関連することが報告されている。また、天然歯の歯周組織とインプラント周囲組織における好中球の細胞分布密度は同様であることが知られている。本研究では、CECAM1 がインプラント周囲上皮と結合組織内に発現していたことから、インプラント周囲組織における免疫防御機構に関与していることが考えられる。

*Ifitm1* は、インターフェロン誘導性膜貫通タンパク質ファミリーに属する白血球抗原で、リンパ球の増殖抑制や同型接着シグナル伝達に関与することが知られている。また、過去の報告から、早期浸潤口腔扁平上皮癌において発現上昇し、さらには *Ifitm1* の発現を抑制した頭頸部腫瘍細胞株においては細胞浸潤が減少することから、腫瘍細胞の浸潤に関与することが示唆されている。今回、インプラント周囲上皮に IFITM1 の局在発現がみられたことから、長期的に発現・上昇することで将来的な口腔癌に発症に関連することが示唆される。

*Muc4* は膜結合型ムチンで、目、膈、気管、唾液腺の表面上皮などの様々な器官での発現が確認されている。口腔領域においては、正常な口腔粘膜では発現しないのに対して、異型上皮や口腔扁平上皮癌に発現することが報告されている。また、膵臓癌細胞における *Muc4* の過剰発現がアポトーシス抑制や腫瘍細胞増殖の亢進に関与することが知られている。また一方で、耳下腺分泌液中にも検出され、上皮の保護に関与することが示唆されている。本研究では、MUC4 はインプラント周囲上皮表層に局在発現がみられたが、継続的かつ過剰な発現が、将来的な腫瘍発生に関与しているのか、上皮表層の保護として機能しているのかについては、病態モデルを用いた検討を行っていく必要があると考える。

本研究で同定された 3 遺伝子 *Ceacam1*、*Ifitm1*、*Muc4* はインプラント埋入によって形成されるインプラント周囲上皮に特異的に発現することが明らかとなったが、腫瘍の発

現過程において、発現の量や局在の変化については明らかとなっていない。今後、4-NQO 投与における自然発癌モデルを用いて、これら 3 遺伝子の関連性を検討することで、インプラント周囲上皮における防御機構の役割や腫瘍発症の早期発見などの診断用マーカーとしての有用性を明らかにすることが出来ると考える。また、本研究で作成されたデータベースには多くの未知遺伝子も含まれており、将来的にこれらの未知遺伝子の機能が明らかになれば、より多くのインプラント周囲上皮の腫瘍発現マーカーが明らかになっていくものと思われる。よって、今後も本研究の結果を基盤として、インプラント治療に伴う口腔粘膜疾患へのリスク評価法を確立していく予定である。

#### <引用文献>

- ① Oral squamous cell carcinoma in association with dental osseointegrated implants. An unusual occurrence. Clapp C, Wheeler JC, Martof AB, Levine PA. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1996 122(12):1402-3.
- ② Squamous cell carcinoma associated with a mandibular staple implant. Moxley JE, Stoelinga PJ, Blijdorp PA. J Oral Maxillofac Surg. 1997 55(9):1020-2.
- ③ Squamous cell carcinoma appearing as peri-implant bone loss: a case report. Block MS, Scheufler E. J Oral Maxillofac Surg. 2001 59(11):1349-52.
- ④ Oral squamous cell carcinoma around dental implants. Czerninski R, Kaplan I, Almoznino G, Maly A, Regev E. Quintessence Int. 2006 37(9):707-11.

#### 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 2 件)

- ① Comparison of Gene Expression in Peri-implant Soft Tissue and Oral Mucosal Tissue by Microarray Analysis  
The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. (in press) 査読有 Yasushi Makabe, Hodaka Sasaki, Gentarō Mori, Hideshi Sekine, Masao Yoshinari, Yasutomo Yajima
- ② The genes *Scgbl1*, *Lpo* and *Gbp2* characteristically expressed in peri-implant epithelium of rats  
Clinical Oral Implants Research. (in press) 査読有 Gentarō Mori, Hodaka Sasaki, Yasushi Makabe, Masao Yoshinari, Yasutomo Yajima

[学会発表] (計 6 件)

①インプラント周囲上皮と付着上皮における遺伝子発現の網羅的解析  
守源太郎, 佐々木穂高, 真壁康, 吉成正雄,  
矢島安朝

第 42 回日本口腔インプラント学会・学術大会

日本口腔インプラント学会誌 特別号 25 巻  
25, 165, 2012

②マイクロアレイ法を用いたインプラント周囲上皮と口腔粘膜上皮の遺伝子発現の比較検討

真壁康, 佐々木穂高, 守源太郎, 吉成正雄, 矢島安朝

第 42 回日本口腔インプラント学会・学術大会

日本口腔インプラント学会誌 特別号 25 巻,  
25, 164, 2012

③マイクロアレイ法を用いたインプラント周囲上皮と口腔粘膜上皮の遺伝子発現の比較検討

真壁康, 佐々木穂高, 守源太郎, 澁川義幸, 吉成正雄, 矢島安朝

第 293 回東京歯科大学学会

歯科学報, 112, 158, 2012

④マイクロアレイ法を用いたインプラント周囲軟組織と口腔粘膜組織の遺伝子発現の比較検討

真壁康, 佐々木穂高, 守源太郎, 吉成正雄, 矢島安朝

第 43 回日本口腔インプラント学会・学術大会

日本口腔インプラント学会誌 特別号 26 巻,  
26, 280, 2013

⑤付着上皮とインプラント周囲上皮における遺伝子発現の網羅的解析

守源太郎, 佐々木穂高, 真壁康, 吉成正雄, 矢島安朝

第 44 回日本口腔インプラント学会・学術大会

日本口腔インプラント学会誌 特別号 27 巻,  
27, 147, 2014

⑥インプラント周囲組織における特異的遺伝子発現の検討

佐々木穂高, 真壁康, 守源太郎, 吉成正雄, 矢島安朝

第 44 回日本口腔インプラント学会・学術大会

日本口腔インプラント学会誌 特別号 27 巻  
27, 262, 2014

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢島 安朝 (YAJIMA Yasutomo)  
東京歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：10183667

### (2) 研究分担者

伊藤 太一 (ITO Taichi)  
東京歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：80312015

古谷 義隆 (FURUYA Yoshitaka)  
東京歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：80385179

本間 慎也 (HOMMA Shinya)  
東京歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：70408334

佐々木 穂高 (SASAKI Hodaka)  
東京歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：50433959

### (3) 連携研究者

真壁 康 (MAKABE Yasushi)  
研究者番号：30707724

守 源太郎 (MORI Gentaro)  
研究者番号：30733745