

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463094

研究課題名(和文) 歯性感染症病変形成時の上皮発現における上皮-間葉移行(EMT)の関与に関する研究

研究課題名(英文) Immunohistochemical and cell biological studies on the epithelial lining in periapical lesions - expression of epithelial mesenchymal transition (EMT) markers and antimicrobial peptides -

研究代表者

石畑 清秀 (Ishihata, Kiyohide)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・助教

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)：根尖病巣における上皮形成は細菌感染に対する二次バリアとしての役目を有しているという仮説の元、根尖病巣における上皮形成様式と抗菌ペプチド、EMTマーカー発現の様相を確認した。また、株化細胞を利用してEMTと細菌感染との関連を検証した。その結果、根尖病巣におけるリンパ球の減少に伴い、嚢胞腔における上皮形成が促進し、組織実験ならびに細胞実験いずれにおいてもE-カドヘリンとα-ディフェンシ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。

研究成果の概要(英文)：Based on the hypothesis that periapical lesions may play an important role as a second barrier in defense mechanisms against bacterial infections, we examined the development of the epithelial lining in periapical lesions and the expression of antimicrobial peptides and EMT markers in tissue specimens. We also investigated the relationship between EMT markers and bacterial infection using immortalized cells. In an attempt to reduce lymphocyte in apical granulomas, an epithelial barrier develops on the surface of the cavity and expresses E-cadherin and α-defencine. Bacterial infection accelerates the expression of E-cadherin in vivo and in vitro; however, the intervention of N-cadherin was not detected in the present study.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯原性上皮細胞 細菌感染 歯根嚢胞 EMT 口腔外科

1. 研究開始当初の背景

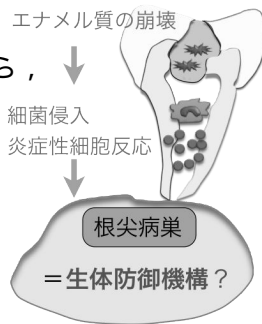
歯胚の形態や細胞の分化は、歯の形成過程において、外胚葉性組織（上皮）と外胚葉性間葉の両者の複雑な誘導的相互作用によって制御されている。歯原性上皮細胞のなかに、歯根形成残遺歯原性上皮と呼ばれるものがある。この残遺上皮は、本来、アポトーシス抑制ならびに増殖抑制があり、死滅もしなければ増殖もしない細胞組織である。しかし、この残遺歯原性上皮の増殖に起因する疾患がある。炎症性刺激による上皮増殖が起こる歯根嚢胞、PTCH 遺伝子、Gli-1,2 の関与が指摘されている角化嚢胞性歯原性瘍、Shh, Wnt, FGF などが増殖に関するエナメル上皮腫などは残遺歯原性上皮細胞に由来する疾患と考えられているが、これらの疾患を示す上皮細胞の病態は未だ明らかになっていない。

歯性感染症の一つとされる歯根嚢胞は歯原性上皮（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。

近年、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いる。つまり、歯根嚢胞上皮の形成には自己防衛反応としての免疫反応が機能しており、細菌感染に対する歯根嚢胞上皮形成は感染の波及を止めようとする自己防衛的な反応であると仮説することができる（下図）。

2. 研究の目的

歯根嚢胞上皮ならびに株歯原性細胞から、細胞増殖関連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、細菌感染時の上皮-間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)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) 臨床サンプルにおける抗菌ペプチドと EMT マーカーの発現解析。

病理組織学的に診断された歯根嚢胞(20例)と歯根肉芽腫(20例)について、抗菌ペプチド（ α -ディフェンシン, LL37, β -ディフェンシン-1, -2), および E-カドヘリン, CK, N-カドヘリン, TGF β を用いて免疫組織化学的に局在を観察した。組織切片はそれぞれ、

4 μ m の厚さとし、抗原賦活化処理は、pH6.0 バッファー中、圧力鍋を用いて処理し、streptavidin-biotin kit (DAB 染色を用いて)にて抗体の染色を行った。200 倍検鏡下において、免疫染色陽性細胞が 10%未滿をスコア 0 とし、11-25%をスコア 1, 26-50%をスコア 2, 51%以上をスコア 3 と判定した。各病期分類に対応させ、歯根嚢胞と歯根肉芽腫における抗菌ペプチドならびに EMT マーカーの免疫染色スコアの比較の Mann-Whitney U 検定を用いた。

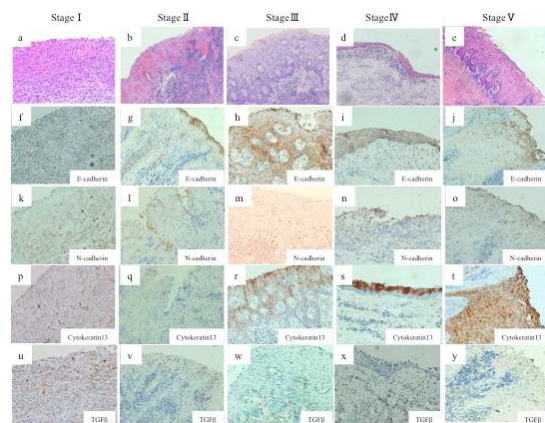
(2) 細菌感染刺激時の歯原性上皮細胞における EMT マーカーの発現解析。

細胞株は、ラット由来歯原性上皮細胞株 (HAT7: ラット切歯 cervical loop から樹立) ならびにマウス由来歯原性細胞株 (HERS01: マウス第一大臼歯樹立した歯原性上皮間葉系細胞)を用いた。細菌感染刺激として、大腸菌由来リポポリサッカライド (LPS) (50, 100, 200ng/ml) を使用した。培地内に上記細菌刺激を添加, 1, 2, 4, 6, 12, 24 時間後に細胞を回収し、Micro-to-Midi total RNA purification system (Invitrogen Life Technology) を用いて RNA 精製を行った。内部標準には GAPDH を用いて、リアルタイム定量 PCR 法にて遺伝子の発現解析を行った。

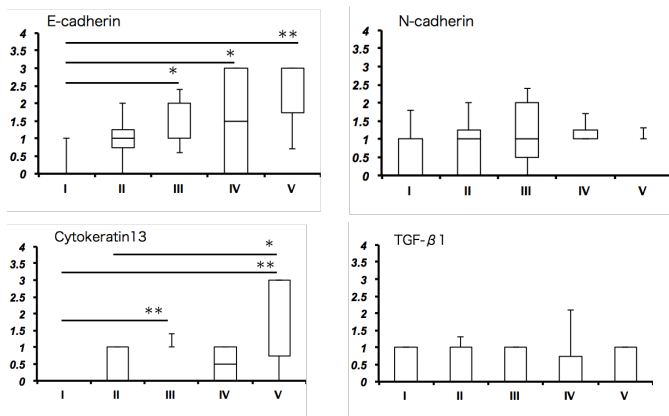
4. 研究成果

(1) 根尖病巣における EMT マーカーの発現様式

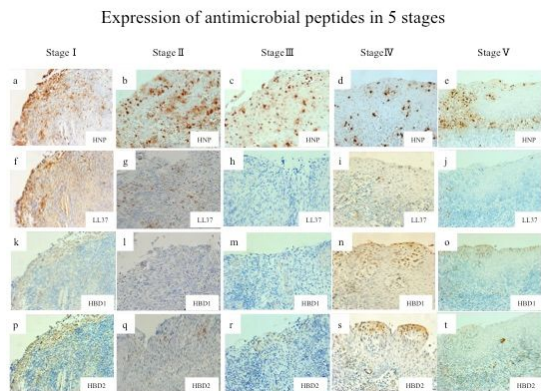
Expression of CK 13 and EMT markers in 5 stages



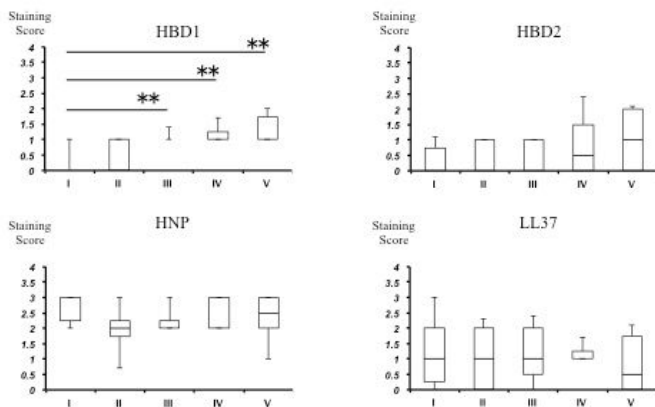
(図 1. 炎症各病期における上皮-間葉系マーカーの発現様式。)



(図2. 各病期の上皮・間葉系マーカーのスコア比較)



(図3. 炎症各病期における抗菌ペプチドの発現様式)

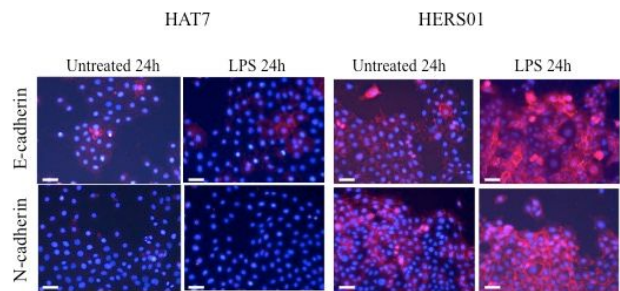


(図4. 各病期抗菌ペプチドのスコア比較)

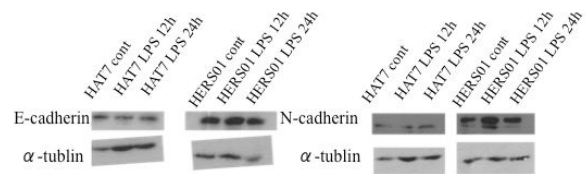
炎症性細胞の減弱と上皮細胞の占める割合が増加する傾向が示され、薄い重層上皮、網状上皮、厚い重層上皮形成を認めた。また、間葉系マーカーならびに TGF-β1 の発現は各病期で軽度観察されたが、炎症の程度との関連性は示されなかった。抗菌性ペプチドの発現に関しては、炎症急性期には好中球主体の抗菌ペプチド (HNP, LL37) の発現増強、炎症慢性期には上皮細胞から発現される HBD1, 2 の発現増強が確認された。免疫組織学的解析

から、根尖病巣急性期には、抗菌ペプチドのうち、主に好中球から分泌される -ディフェンシンと LL37 が分泌され、炎症性細胞が減少し、炎症慢性期に移行するに従って、分泌される抗菌ペプチドは -ディフェンシンへ変化しつつ、上皮化傾向が増強することが示唆された。

(2) 歯原性細胞株における細菌感染刺激時の EMT マーカーの発現



(図5. HAT7 ならびに HERS01 の LPS 刺激環境下における E,N-カドヘリン細胞免疫染色)



(図6. Western blot による HAT7 ならびに HERS01 の LPS 刺激環境下における E,N-カドヘリンの発現解析)

細菌感染刺激存在下で、HAT7 ならびに HERS01 において、上皮系マーカー (E-cadherin) の発現増強を認めたが、間葉系マーカー (N-cadherin) の発現に変化を認めなかった。

歯牙は、一次バリアーと称されるエナメル質によって外界病原微生物の刺激から防御されている。しかし、齶蝕や外傷等でエナメル質が崩壊し、病原微生物が侵入し、感染が歯髄に及べば、根管を介して速やかに根尖部へ感染が波及する。歯根肉芽腫や歯根嚢胞は、感染根管から進展した根尖部歯性感染症とされるが、根尖病巣部からの抗菌性物質の発現ならびに嚢胞上皮形成は、感染の波及を制御する生体防御反応と考えられる。今回、歯根肉芽腫ならびに歯根嚢胞切片を用いた実験から、リンパ球浸潤の減少に代わり、E-cadherin、ならびにcytokeratin13の発現が増強し、上皮細胞の増殖を示していた。また、歯原性細胞を用いた実験においても、細菌感染刺激に対

し、上皮化を促進させ、物理的な生体防御機構を発揮することが示唆された。

従来、根尖病巣の発症機序には歯源性残存上皮の増殖が起因すると言われているが、今後、嚢胞形成時の上皮発生・増殖機構解明に関しては、さらなる検討が必要と思われた。

研究者番号：90253088

嶋 香織 (SHIMA KAORI)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教
研究者番号：10343526

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1件)

石畑清秀, 久米 健一, 田中荘子, 小松澤均, 中村典史: EBM 学術論文: 歯源性上皮細胞の感染防御メカニズムに関する基礎的研究. Teethful (鹿児島県歯科医師会雑誌), 107(8,9): 8-10, 2014.

[学会発表](計2件)

[poster presentation] Kiyohide Ishihata, Shoko Tanaka, Takao Fuchigami, Hitoshi Komatsuzawa, Hidemitsu Harada, Norifumi Nakamura. Immunohistochemical and cell biological studies on the epithelial lining in periapical lesions - expression of epithelial mesenchymal transition (EMT) markers and antimicrobial peptides - 63rd Annual Meeting, Japanese Association for Dental Research, 2015, 10/30-31, Fukuoka.

[ポスター発表] 石畑清秀, 田中荘子, 久米健一, 中村典史. 歯根肉芽腫・嚢胞の上皮-間葉系マーカーの発現に関する基礎的研究. 第58回日本口腔外科学会総会 10月11-13日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2013年.

[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)研究代表者

石畑 清秀 (ISHIHATA KIYOHIDE)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：10437957

(2)研究分担者

中村 典史 (NAKAMURA NORIFUMI)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授
研究者番号：60217875

小松澤 均 (KOMATSUZAWA HITOSHI)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授