

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893274

研究課題名(和文) 歯胚再生技術を用いたGFP陽性接合上皮細胞の単離による特異的遺伝子発現の解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of gene expression in the junctional epithelium from bioengineered tooth.

研究代表者

氷室 沙羅 (Himuro, Sara)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90736513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、歯原性上皮を蛍光蛋白であるGFPで標識した再生歯胚を作製し、そのマウス顎骨内移植モデルを用いて、接合上皮が歯原性上皮由来であることを見いだしてきた。本研究では、当該モデルを用いて、GFPを指標に、これまで単離の難しかった接合上皮を採取し、酵素反応液にて分散化の後、回収した上皮細胞をフローサイトメトリーを用いて、接合上皮をGFP陽性分画として、口腔上皮をGFP陰性分画として採取し、microarrayを用いて発現遺伝子を網羅的に解析した。結果、接合上皮では、口腔上皮と比較してsecretory leukocyte protease inhibitor (Slpi)が高度に認められた。

研究成果の概要(英文)：【Background】 We isolated junctional epithelium (JE) cells which expressed green fluorescent protein (GFP) by using a bioengineered tooth technique in mice. The aim of this study was to perform a comprehensive analysis of gene expression in JE using a bioengineered tooth germ method.

【Materials and Methods:】 Bioengineered tooth germs, which consisted of GFP-transgenic mouse-derived epithelial cells and normal mouse-derived mesenchymal cells, were cultured for 4 days. They were transplanted into alveolar bone in normal mice. GFP-positive JE cells around erupted bioengineered teeth were isolated by flow cytometry and analyzed by RNA sequencing and real-time PCR. 【Results】 The expression of secretory leukocyte protease inhibitor (Slpi) was increased in JE cells compared with palatal gingival epithelial cells. 【Conclusion】 We determined that Slpi is characteristically expressed in JE cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：接合上皮

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯垢中に含まれるプラーク細菌由来物質の刺激で歯周組織に炎症が惹起され、エナメル質に直接附着する接合上皮が破壊されることから発症する。感染防御の最前線に位置する接合上皮の研究は、歯周病の病態、予防、治療、再生のメカニズムを解明する上できわめて重要で、これまでも様々な報告がなされてきた。しかしながら、接合上皮は生体内で最も固いエナメル質近傍の極めて狭い空間に位置する上に、未だに特異的マーカーが明らかにされていないことから、その単離は難しく詳細な解析は行われていないのが現状であった。我々は、近年、歯原性上皮を蛍光蛋白である GFP で標識した再生歯胚を作製し、そのマウス顎骨内移植モデルを用いて、接合上皮が歯原性上皮由来であることを見いだした。(Sci Rep. 2014 4:4867)。本研究の目的は、当該モデルを用いて、GFP を指標に、これまで単離の難しかった接合上皮を採取し、その発現遺伝子を網羅的に解析することにより接合上皮の特異的マーカーを明らかにすることにある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、当該モデルを用いて、GFP を指標に、これまで単離の難しかった接合上皮を採取し、その発現遺伝子を網羅的に解析することにより接合上皮の特異的マーカーを明らかにすることにある。

## 3. 研究の方法

### (1)GFP で置換された接合上皮の作製とその単離

GFP 陽性歯原性上皮・野生型 C57BL/6 マウスの間葉組織の再構成歯胚の作製  
実体顕微鏡を用い、胎生 15 日の GFP マウスと同齢の野生型マウスから歯胚を摘出した。摘出した歯胚それぞれをディスペーゼ処理し、歯原性上皮組織と間葉組織に分離した後、

GFP マウス歯胚の歯原性上皮組織と野生型マウスの間葉組織をコラーゲンゲル内で再構成し、37 4 日間器官培養した。

### 再構成歯胚の移植

レシピエントとして、ソムノペンチル麻酔下で 3 週齢の野生型マウスの上顎第一臼歯を抜歯、その後、2 週間治癒を待った。治癒を確認後、同様に麻酔下で歯胚を埋入した。具体的には、口蓋側に切開線を引き、歯肉を剥離翻転、直径、高さ 1 ミリの移植窩を形成する。歯胚の上皮側をメチレンブルーにて染色し、移植の方向性を確認した。歯胚を埋入後、歯肉を元の位置に戻し、縫合をおこなった。歯胚の発生状況と萌出の方向性についての確認は、マイクロ CT を用いて、硬組織が形成され始める移植後 16 日、萌出が開始される移植後 30 日に行った。

GFP で置換されたマウス接合上皮の外科的単離

接合上皮の回収時期は、萌出完了の移植後 50 日とした。頸椎脱臼にてマウスを屠殺後、上顎を分離し、蛍光実体顕微鏡下で、上顎第一臼歯相当部に萌出した再構成歯近傍の接合上皮と口腔上皮を回収した。

(2)酵素処理を用いた接合上皮細胞の分散化  
回収した組織を 1.25U/mL ディスペーゼで処理後、結合組織と分離し、0.25%トリプシン・50U/mL コラゲナーゼを用いた酵素反応液にて処理し、上皮細胞を分散化した。

(3)フローサイトメトリーを用いた GFP 陽性接合上皮細胞の単離

回収した上皮細胞を、フローサイトメトリーを用いて、接合上皮を GFP 陽性分画として採取し、また、GFP 陰性分画として口腔上皮を採取した。

(4)cDNA microarray を用いた網羅的遺伝子解析

cDNA microarray を用いて、GFP 陽性接合上皮細胞と GFP 陰性の口腔上皮細胞の遺伝子発現を比較検討した。

(5)発現が確認された遺伝子の免疫染色を用いたタンパク発現と局在の確認

GFP 陽性接合上皮で、口腔上皮と比較して、10 倍以上の発現を確認出来た代表的な遺伝子に関しては、免疫組織化学を用いて、タンパク発現とその局在を確認した。

#### 4. 研究成果

GFP マウスの歯原性上皮を用いた再構成歯胚を作製し、その萌出を経ることで、GFP で標識された接合上皮の作製に成功した。さらに、GFP を指標に、これまで単離の難しかった接合上皮を採取し、その発現遺伝子を網羅的に解析することを可能にした。網羅的遺伝子解析の結果、口腔上皮との比較で、接合上皮では Secreted Leukocyte Protease Inhibitor(SLPI)が恒常的に多く発現していることを突き止めた。この結果は、我々が過去に、接合上皮の特徴を明らかにする目的で、4 週齢の ICR マウスの非脱灰凍結切片から、レーザーマイクロダイセクション法により接合上皮部分を単離し、発現遺伝子の網羅的解析を行った際に得た結果と一致した(J Periodontal Res. 2010 45:618-25)。

過去に我々は、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、顕微鏡下で、接合上皮特定を行い、その採取を行ってきた。確かに、レーザーマイクロダイセクション法は特定部位を細胞レベルで採取する方法としては優れた点を有しているが、その採取は顕微鏡下で形態学的な判別により行われることより、血球系や間質由来の細胞など目的以外の細胞の混入を完全に除外することは困難であった。本研究で用いた再構成歯胚技術では、接合上皮が GFP で標識されていることより、flow cytometry を組み合わせられることから、より正確で純度の高い接合上皮細胞の採取が可能となり、本研究の結果から、口腔上皮との比較で、接合上皮では Secreted Leukocyte Protease Inhibitor(SLPI)が恒常

的に発現している可能性がより強まった。小腸の陰窩などにも存在する SLPI は、内因性の攻撃から上皮組織を保護する役割を持つことが知られている。接合上皮は、外来異物の侵入に最前線に対峙し、常に好中球の浸潤が観察されるため、SLPI は、小腸と同様に、接合上皮細胞の自己融解を防御していると推察される。

接合上皮は、エナメル質と直接接する上皮であり、非角化で、活発な分裂と好中球を始めとする種々の物質透過を行う、非常に特色豊かな組織である。しかし、接合上皮は硬組織に隣接する細胞数の大変少ない組織であるために、接合上皮細胞の同定と分離は容易でなく、過去に行われた研究は形態学的なものが主であり、分子生物学的な解析は十分に行われていない。このため、特徴的な遺伝子発現も特徴的なマーカーも確認されておらず、接合上皮細胞の培養細胞株も確立されていなかった。本研究で、我々は、GFP でマーキングされた接合上皮を単一細胞化することに成功した。今後は、接合上皮細胞を不死化し、株化樹立を目指す予定である。

#### <引用文献> \_

Sara Yajima-Himuro, Masamitsu Oshima, Gou Yamamoto, Miho Ogawa, Madoka Furuya, Junichi Tanaka, Kousuke Nishii, Kenji Mishima, Tetsuhiko Tachikawa, Takashi Tsuji, Matsuo Yamamoto. The junctional epithelium originates from the odontogenic epithelium of an erupted tooth. Scientific Reports 2014 4:4867

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 Periodontal Res. 2010

45:618-25

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

氷室 沙羅, 相澤 怜, 関 辰明, 山本 松男  
再構成歯胚を用いた接合上皮の起源の探索  
第143回日本歯科保存学会・2015年秋季学術大会  
2015年11月12日-13日(東京) P.194 (ポスター発表)

Sara Yajima-Himuro, Junichi Tanaka, Ryo Aizawa, Tatsuaki Seki, Kenji Mishima, Matsuo Yamamoto  
Reconfirmation of the origin of the junctional epithelium by using the bioengineered tooth germ  
EuroPerio 8 June 3-6, 2015 英国(ロンドン) (ポスター発表)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

氷室 沙羅 (HIMURO, Sara)

昭和大学 歯学部 歯周病学講座 助教

研究者番号: 90736513

### (4)研究協力者

田中準一 (TANAKA, Junichi)

相澤 怜 (AIZAWA, Ryo)

関 辰明 (SEKI, Tatsuaki)

美島 健二 (MISHIMA, Kenji)

山本 松男 (YAMAMOTO, Matsuo)