

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
窪 木 拓 男 印	研究総括ならびに指導
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 <small>インプラント再生補綴学分野</small>	身分 大学院生	氏名 植田 淳二
論文題名 口腔粘膜上皮における角化因子の探索		
論文内容の要旨 (2000 字程度)		
<p>【緒言】</p> <p>健全な歯の周囲には粘膜上皮が角化した歯肉（以下、角化歯肉）とそれに連続して根尖側方向には可動性をもった非角化歯肉である歯槽粘膜が存在する。臨床的には、角化歯肉は過剰なメカニカルストレスから歯周組織を守り、長期的に安定した状態を維持するために必要不可欠と考えられている。歯周病等で角化歯肉を失い、辺縁歯肉が歯槽粘膜のみとなった場合、角化歯肉の再獲得法としては現在のところ遊離歯肉弁移植術が唯一の方法である。しかし、歯槽粘膜を角化歯肉に組織誘導できれば、より低い侵襲で角化歯肉の再獲得が可能となるかもしれない。そのような臨床手技の実現のためには、口腔粘膜上皮を角化誘導する生物学的因子の解明が不可避である。従って本研究では、口腔粘膜上皮の角化に関与する因子を同定することを目的に、以下の実験を実施した。</p> <p>【研究方法と結果】</p> <p>はじめに、イソジン染色にてラット口腔粘膜の角化歯肉と非角化歯肉である歯槽粘膜の境界を明示し、上皮および結合組織を含む角化歯肉および歯槽粘膜組織を別々に採取した。それぞれの組織が特異的に採取できていることを、角化のマーカーである Keratin 1 (K1) および Keratin 10 (K10) の免疫組織化学染色及び定量性 RT-PCR 法にて確認した。次に、これらのサンプルを用い cDNA Microarray 解析を行った。その結果、角化歯肉、歯槽粘膜は相似した遺伝子プロファイルを持った組織であった。また、角化細胞は基底層から細胞分裂することで発生し、表層に向け分化が亢進すること、また、上皮細胞の角化において基底膜が重要な役割を果たすことが知られているため、基底膜に注目し、角化歯肉において 3 倍以上発現している遺伝子群の中で、基底膜の構成分子である細胞外マトリックス関連遺伝子を付属のソフトウェアを用い抽出した。その結果、基底膜構成分子の一つである Laminin (Lam) $\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$ が同定された。</p> <p>次に、Lam$\alpha 3\beta 3\gamma 2$ が口腔粘膜上皮細胞の角化に関与しているかを検討するため、ヒト口腔扁平上皮癌細胞である TR146 をヒト口腔粘膜由来上皮細胞として用いた。また、上皮細胞の分化誘導には Thin Cert 細胞培養インサートを用い、グライナー・ジャパン社のプロトコールに従い実施した。実際には、上部チャンバーである 24 well plate 用 Thin Cert 細胞培養インサートに 5×10^5 個/well の高濃度の TR146 を播種し、上皮細胞培養培地にて 1 日間培養した。TR146 が細胞培養インサートに接着したのを確認した後、上部チャンバーには培地を加えず、下部チャンバーに 0, 300 および 1000 ng/mL の recombinant human Laminin332 (rhLAM332) 含有上皮細胞培養培地を加え、4 日毎に培地交換を行い、20 日間培養し、K1, K10 の発現量を定量性 RT-PCR 法および免疫細胞化学染色を用い評価した。その結果、K1, K10 遺伝子発現量、タンパク質量共に rhLAM332 の濃度に依存して、有意に上昇した。</p> <p>最後に、基底膜が上皮と結合組織の間に形成されることから、角化歯肉と歯槽粘膜の基底膜の Laminin332 発現の相違は結合組織の相違に由来するという仮説を立て、角化歯肉由来線維芽細胞が歯肉の角化に与える影響を検討した。つまり、上皮細胞と線維芽細胞の共培養実験を行うため、上部チャンバーである Thin Cert 細胞培養インサートに 1×10^5 個/well の角化歯肉または歯槽粘膜由来線維芽細胞を播種し、線維芽細胞培養培地にて 1 日間培養した。線維芽細胞が細胞培養インサートに接着したのを確認した後、5×10^5 個/well の TR146 を播種し、さらに 1 日間培養した。TR146 が細胞</p>		

論文内容の要旨（2000字程度）

培養インサートに接着したのを確認した後、上部チャンバーには培地を加えず、下部チャンバーにのみ上皮細胞培養培地を加え、4日毎に培地交換を行い、28日間培養した。その結果、角化歯肉由来線維芽細胞と共培養した TR146 において、Lama3 (1.2 倍, $p<0.05$), Lamy2 (1.4 倍, $p<0.05$) の遺伝子発現量は有意に促進され、上皮角化のマーカーである K1 (2.0 倍, $p<0.05$), K10 (1.5 倍, $p<0.05$) の遺伝子発現量も有意に促進された。また、免疫細胞化学染色の結果、LAMa3, K1, K10 のタンパク質の発現も角化歯肉由来線維芽細胞と共培養した群において促進された。

【結論】

基底膜の構成分子の一つである Laminin332 が口腔粘膜上皮の角化・非角化の制御分子の一つであることが明らかとなった。また、口腔粘膜上皮細胞の角化および Laminin332 の発現は、歯肉上皮組織下層にある結合組織により制御されている可能性が示唆された。