

論文要旨等報告書

氏	富川 和哉
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 4 3 4 0 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Smad2による歯肉創傷治癒の再上皮化抑制に関する研究
論文審査委員	教授 山本 敏男 准教授 久保田 聡 教授 高柴 正悟

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周組織は、外胚葉系組織である歯肉上皮と、間葉系組織である歯根膜、歯槽骨、およびセメント質から構成されている複雑な組織である。歯周炎の進行により破壊されたこれらの組織を再生させるには、外胚葉系組織である歯肉上皮の接合深部への増殖を抑制し、間葉系細胞が再生するための時間的および空間的な場を提供することが必須と考えられている。このことは、上皮細胞の増殖スピードが間葉系細胞のそれと比較して速いことに起因する。近年、トランスフォーミング増殖因子 β (transforming growth factor- β : TGF- β) は Smad シグナルを介した上皮の創傷治癒過程において重要な役割を果たすことが報告されている。過去の報告から、*keratin 14* プロモーター制御下で *Smad2* を上皮特異的に過剰発現させたマウス (TG) において、増殖細胞数の減少傾向とともに細胞遊走能が低下することで、皮膚の創傷治癒が遅延することが報告されている。細胞遊走は、細胞と細胞間に存在する細胞外マトリックス (ECM: extracellular matrix) の細胞先端での接着および細胞後端での解離の繰り返しによって起こる。細胞の接着に関して、インテグリンは細胞遊走を促進させる主要なレセプターとしてこれらの接着を支える役割をもち、また、インテグリンの細胞内ドメインに結合してシグナルインテグレートラとして作用する focal adhesion kinase (FAK) は、遊走細胞後縁部における ECM との解離も調節することで細胞遊走を制御している。加えて、細胞遊走には、上皮細胞特有の中間径フィラメントであるサイトケラチンの働きが重要である。上皮組織が損傷を受けた場合、上皮細胞の遊走に先立って発現し、ケラチン線維の再構築に重要な働きをすることが報告されている。

以上の背景から、本研究では、TG の口蓋粘膜における創傷治癒過程の違いを WT と比較し、そのメカニズムを明らかにすることを目的に、創傷歯肉の免疫組織化学的解析を行い、再上皮化における細胞増殖および細胞遊走関連分子の発現を調べた。

【材料・方法】

1. マウス: 9~10 週齢の WT と TG を実験に用いた。
2. ウェスタンブロット法: 細胞総蛋白を SDS-PAGE にて分画し、Smad2, P-Smad2 および TGF- β 1 の蛋白産生量を定量した。
3. 免疫蛍光染色法: Smad2, およびリン酸化 Smad2 (P-Smad2) の局在を免疫染色して蛍光顕微鏡で検出した。
4. 口蓋粘膜における創傷治癒モデルの作製: WT と TG の第一大臼歯近傍の口蓋粘膜に直径 1 mm の骨膜に達する欠損を作製し、7 日目までの最大直径と最小直径の平均値をもって創傷治癒を比較した。
5. 創傷部における上皮細胞の動態解析
 - 1) 細胞遊走関連分子の解析: 創傷治癒開始 2 日目の口蓋粘膜を採取し、ウェスタンブロッティングによって FAK, integrin α 3, keratin 16 (K16) のタンパク産生量を調べた。また、Smad2 と K16 の局在を免疫蛍光染色して蛍光顕微鏡で検出した。
 - 2) BrdU 染色: 創傷治癒開始 2 日目の口蓋粘膜を採取し、細胞周期の S 期における細胞 DNA への bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みを検出した。

【結果】

1. TG の Smad2 と P-Smad2 のタンパク量は、WT のものと比較して多かった ($p < 0.01$; Student's t-test)。
2. TG の口蓋粘膜では、WT のものと比較して、Smad2 および P-Smad2 の局在シグナルが基底膜において強かった。TG の Smad2 と P-Smad2 量は、WT のものより有意に増加した。
3. TG の創傷治癒は、WT と比較して、欠損作製後 2 日目で遅延していた ($p < 0.01$; Student's t-test)。
4. 欠損作製後 2 日目の創傷治癒部において、TG の K16 のタンパク量は WT のものと比較して少なかったが、integrin $\alpha 3$ と FAK には差がなかった ($p < 0.05$; Student's t-test)。また、TG の遊走している歯肉上皮では、WT と比較して、Smad2 の局在シグナルが強く発現し K16 の局在シグナルは弱かった。
5. WT と TG の BrdU 陽性細胞数には差がなかった。

【考察】

創傷後 2 日目における創傷治癒部周囲の口蓋粘膜に発現する種々のタンパクの定量解析から、TG の再上皮化における遊走能の低下には、細胞と ECM 間の接着と解離に関与する integrin $\alpha 3$ と FAK よりも、K16 の発現の減少が関与していることが考えられる。加えて、Smad2 と K16 の局在解析から、TG における口蓋粘膜の欠損部に伸展した上皮組織では K16 の発現部位に一致して Smad2 が強く発現しており、Smad2 過剰発現が K16 の発現が抑制されることへの関与が考えられる。

また、BrdU 染色の結果から、WT および TG において epithelial tongue には、BrdU 陽性細胞はほとんど検出されなかった。このことは、欠損部への上皮組織の伸展に対する上皮細胞の増殖能の関与は小さいことを示唆しており、再上皮化の初期は K16 を介した細胞遊走が主体であると考えられる。

以上のことから、TG の創傷後 2 日目における創傷治癒の抑制は、再上皮化の段階において Smad2 の過剰発現が K16 の発現を低下させた結果として、上皮細胞の遊走能が抑制されたことに起因するものである可能性が示された。

【結論】

Smad2 を過剰発現した歯肉上皮では、K16 の発現低下に伴って、創傷治癒における再上皮化が抑制された。