

氏名	小盛 大志
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5702号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	口腔粘膜上皮の角化制御における Collagen IV $\alpha 6$ の役割
論文審査委員	長塚 仁 教授      池亀 美華 准教授      西田 崇 准教授

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

歯の周囲に存在する角化した歯肉組織は細菌感染や過剰なメカニカルストレスに抵抗することにより、健康な歯周組織の維持に重要な役割を担っている。そのため、角化した歯肉組織を失った患者においては、その再獲得を目的に遊離歯肉弁移植術が施行される。しかし、本術式はドナーサイトへの外科的侵襲があること、また安定して角化歯肉を獲得することが困難であることなどにより、ドナーサイトへの外科的侵襲を伴わない新しい生物学的な角化歯肉獲得法の開発が望まれている。しかし、歯肉の角化制御メカニズムすら十分に理解されていないのが現状である。

基底膜とは、上皮組織と間葉組織の間に形成される細胞外マトリックスの構造物であり、上皮細胞の足場として働き、上皮組織の機能や臓器の恒常性維持に関わっており、組織や臓器によってその構成分子が異なることが知られている。基底膜の主要構成分子の一つであるIV型コラーゲンは、3つの $\alpha$ 鎖がtriple helix構造を呈しており、その組み合わせは、 $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ 、 $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ 、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ の3つが知られ、 $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ 分子はあらゆる基底膜に広く分布するのに対し、 $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ 分子と $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子は組織特異性を有している。実際、 $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ は糸球体やボーマン嚢に分布し、その遺伝子変異により腎機能障害や眼科的異常を呈するアルポート症候群が発症することが知られており、基底膜の変化が臓器の機能に大きな影響を与えることが伺える。

そこで本研究では、臓器の形成・維持に重要とされる基底膜の構成成分の相違が口腔粘膜上皮の角化・非角化を制御しているという仮説のもと、口腔粘膜の角化に関わる基底膜分子を同定し、その作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 【材料および方法】

1. 口蓋粘膜と頬粘膜の組織学的解析：マウス口腔内における口蓋粘膜と頬粘膜の相違を組織学的に検討するために、8週齢マウスの前頭断の凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色) およびKeratin10 (KRT10) に対する免疫組織化学染色を行った。

2. 角化歯肉と非角化歯肉の基底膜構成成分の比較検討：角化歯肉と非角化歯肉の基底膜構成成分の相違を解析するため、8週齢マウスの前頭断の凍結切片を使用し、IV型コラーゲン $\alpha 1$ - $\alpha 6$ 鎖に対する免疫組織化学染色を行った。
3. 発生期における歯肉角化とIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の発現解析：口蓋粘膜の発生期における $\alpha 6$ 鎖の発現と歯肉角化の時系列を検討するため、マウス胎生12.5日から18.5日の凍結切片を作製し、HE染色及び免疫組織化学染色を行った。
4. *Col4a6*遺伝子欠損マウス (KOマウス)の解析：*in vivo*におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の機能解析のためにKOマウスとWTマウスの口蓋粘膜において、KRT10に対する免疫組織化学染色を行った。
5. ヒト口腔粘膜上皮細胞 (human gingival epithelial cells:hGECs) の3次元培養：*in vitro*におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の機能解析のために、hGECsを、細胞培養インサートにて3次元培養し、RNAを抽出した。また、IV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の遺伝子発現抑制のために*COL4A6*に対するsiRNAを遺伝子導入し、同様に3次元培養を行い、RNAおよびタンパク質を抽出し、定量性RT-PCR法およびwestern blotting法にて解析した。
6. 統計解析：各データの統計学的有意性は、各条件に対して試料の数値を測定し、一元配置分散分析と多重比較検定、対応のないt検定を用いて検討した。

## 【結果と考察】

### 1. 口蓋粘膜と頬粘膜における組織学的解析

HE染色より、マウス口蓋粘膜および頬粘膜ともに上皮最外層には錯角化した細胞層が観察された。しかし、KRT10の発現は口蓋粘膜と遊離歯肉に観察され、頬粘膜には観察されなかった。つまり、口蓋粘膜はKRT10陽性の角化粘膜であり、頬粘膜はKRT10陰性の非角化粘膜であることが確認された。

### 2. 角化歯肉と非角化歯肉の基底膜における網羅的なIV型コラーゲンの発現解析

頬粘膜と比較し口蓋粘膜の基底膜においてIV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖が高発現していることが確認された。つまり、IV型コラーゲン $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子が角化粘膜に高発現していることが明らかとなった。

### 3. 発生期におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖とkeratin 10の発現解析

口蓋粘膜において、KRT10は口蓋閉鎖後の胎生18.5日以降でその発現が確認された。一方、 $\alpha 6$ 鎖は口蓋の閉鎖より早く、胎生14.5日に発現を認め、発生とともに、その発現範囲部位が口蓋において拡大していく事が確認された。

### 4. *in vivo*におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の機能解析

口蓋粘膜におけるKRT10の発現は生後0日および28週齢マウスでは、WTマウスと比較し、KOマウスにおいて有意に低下していた。つまり $\alpha 6$ 鎖を含む $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ 分子が口腔角化粘膜上皮の形成や角化の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

### 5. *in vitro*におけるIV型コラーゲン $\alpha 6$ 鎖の機能解析

hGECsの3次元培養の結果、培養開始3日目に*COL4A6*の遺伝子発現が認められ、7日目まで発現上昇を認めた。一方、*KRT1*および*KRT10*は、培養開始3日目まで発現変動を

認めず、培養7日目において有意な遺伝子発現の上昇を認めた。さらに *COL4A6* の遺伝子発現を抑制すると、*KRT1* と *KRT10* の発現は有意に低下した。また、*KRT10* のタンパク質の発現も低下していることが確認された。

角化歯肉の基底膜には、非角化歯肉の基底膜と比較し、IV型コラーゲン $\alpha5/\alpha5/\alpha6$ 分子が高発現していることが明らかとなり、歯肉上皮組織の角化制御に関わっている基底膜成分の一つであることが明らかとなった。一方上皮組織の恒常性維持には上皮幹細胞が関わっており、基底膜はその幹細胞性維持に重要である。基底膜に存在する $\alpha5/\alpha5/\alpha6$ 分子が角化歯肉の上皮幹細胞の幹細胞性維持に関わっている可能性も伺えるため、今後、 $\alpha5/\alpha5/\alpha6$ 分子と口腔粘膜上皮幹細胞ニッチの関係を詳細に検討していく予定である。

## 【結論】

角化歯肉であるマウス口蓋粘膜の基底膜では、非角化粘膜である頬粘膜と比較し、IV型コラーゲン $\alpha5/\alpha5/\alpha6$ 分子が高発現していることが確認された。マウス口蓋粘膜の発生過程において、 $\alpha6$ 鎖の発現後に角化マーカーであるケラチン10の発現が亢進することが確認された。さらに、遺伝子欠損マウスおよびsiRNAを用いた機能阻害実験の結果から、 $\alpha6$ 鎖を含む $\alpha5/\alpha5/\alpha6$ 分子が口腔角化粘膜上皮の形成や角化の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

歯の周囲に存在する角化歯肉は、細菌感染や過剰なメカニカルストレスに抵抗することにより、健康な歯周組織の維持に重要な役割を担っている。そのため、角化歯肉を失った患者においては、その再獲得を目的に遊離歯肉弁移植術が施行されるが、ドナーサイトへの外科的侵襲があること、また安定して角化歯肉を獲得することが困難であることなどにより、外科的侵襲を伴わない新しい生物学的な角化歯肉獲得法の開発が望まれている。基底膜は、上皮細胞の足場として働き、上皮組織の機能や臓器の恒常性維持に関わっており、組織や臓器によってその構成分子が異なることが知られている。基底膜の主要構成分子の一つであるIV型コラーゲンは、3つの $\alpha$ 鎖がtriple helix構造を呈しており、その組み合わせは、 $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ 、 $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ 、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ の3つが知られ、 $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ はあらゆる基底膜に広く分布するのに対し、 $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ と $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ は組織特異性を有している。実際、 $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ は糸球体やボーマン嚢、水晶体に分布し、その遺伝子変異により腎機能障害や眼科的異常を呈するアルポート症候群が発症することが知られており、基底膜の変化が臓器の機能に大きな影響を与えることが伺える。

そこで本研究では、臓器の形成・維持に重要とされる基底膜の構成成分の相違が口腔粘膜上皮の角化・非角化を制御しているという仮説のもと、口腔粘膜上皮の角化に関わる基底膜分子を同定し、その作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

研究結果は、以下の内容であった。

1. 角化上皮であるマウス口蓋粘膜上皮の基底膜では、非角化上皮である頬粘膜上皮の基底膜と比較し、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$  (IV) が高発現していることを確認した。
2. マウス口蓋粘膜上皮の発生過程において、 $\alpha 6$  (IV) 鎖の発現レベル上昇後に角化マーカーであるケラチン (KRT) 10 の発現レベルが亢進することを確認した。
3. 口蓋粘膜上皮における KRT10 の発現は生後 0 日および 28 週齢マウスでは、WT マウスと比較し、*Col4a6*-KO マウスにおいて有意に低下していた。
4. siRNA を用いたヒト口腔粘膜上皮細胞株 (hGECs) の *COL4A6* 遺伝子発現抑制実験において、*KRT1* と *KRT10* の発現レベルは有意に低下し、KRT10 のタンパク質の発現レベルも低下していることを確認した。

以上の結果から、口腔粘膜における角化上皮組織の基底膜には、非角化上皮の基底膜と比較し、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$  (IV) 分子が高発現していることが明らかとなり、 $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$  (IV) 分子が口腔粘膜上皮の角化制御に関わる基底膜成分の一つであることが明らかとなった。

以上に基づき、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。