

氏名	河村 麻理
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5485号
学位授与の日付	平成29年3月24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)
学位論文の題目	インテグリンサブユニットが歯根膜線維芽細胞の遊走に及ぼす影響
論文審査委員	仲野 道代 教授 原 哲也 准教授 高柴 正悟 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周病は歯周病原細菌を含む口腔常在細菌による内因性感染症であり、清掃不良と全身疾患による生体防御機能の低下は歯周組織の恒常性の破綻を起こす。日常臨床で行われている機械的な方法によって感染源を除去すると、組織損傷が生じ、創傷治癒が起こる。その際、創傷部位の治癒形態には、組織幹細胞の遊走・増殖の時間・空間的な制御が重要となる。歯周組織再生においては、歯槽骨欠損部の歯根面に最初に遊走してくる細胞によって治癒形態が決定づけられる。従って、歯周組織の恒常性を維持するために必要な結合組織性付着を獲得するために、歯根膜由来細胞が遊走することが非常に重要である。

近年、細胞周囲の微小環境が細胞遊走を含む全ての細胞挙動を制御することが明らかとなっている。歯周組織再生では微小環境の一つである成長因子に着目して研究が進められており、臨床応用が進んでいることから、今後は、再生した組織の恒常性の維持を目指すことが重要となる。この、恒常性の維持にはインテグリンの活性化と、そのリガンドであるECMへの結合調整によって歯根膜線維芽細胞の遊走を制御することが必要となるがそのメカニズムは未だ不明である。

本研究では、歯根膜線維芽細胞が遊走時に発現するインテグリンサブユニットの解明と、さらにそのインテグリンの発現制御が遊走能に与える影響の解明を図った。

【材料と方法】

1. **試薬**: 細胞遊走刺激因子として、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) およびplatelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) を用いた。また細胞増殖阻害剤としてmitomycin C (MC) を用いた。
2. **細胞の分離・培養**: 健康なヒト抜去歯から分離・培養した線維芽細胞様細胞である歯根膜線維芽細胞を用いた。培養は、20%ウシ胎児血清、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (PS) を含むMinimum Essential Medium Eagle Alpha Modificationを用いて、37°C, 5%, CO₂存在下で行った。2~5継代の細胞を実験に用いた (岡山大学研究倫理審査委員会: 承認番号2070)。また歯肉由来細胞としてCa9-22細胞を10%ウシ胎児血清、1% PSを含むDulbecco's Modified Eagle Mediumを用いて上記と同条件下で培養し、4~8継代の細胞を実験に用いた。以降、全ての実験系において、血清濃度が0.1%の培地で24時間培養して、細胞周期を同調させた。細胞を 3.75×10^4 cells/cm² で培養皿に再播種し、9時間経過時に細胞接着を確認し、MC (1 μ g/mL) を培地に添加してさらに1時間後培養することで細胞増殖を阻害したものを使用した。なお結果1はMC無添加の条件で行った。
3. **細胞活性試験**: 歯根膜線維芽細胞を各種刺激因子で刺激し、38時間後にMTS法を用いて細胞活性を測定した。
4. **細胞遊走試験**: 歯根膜線維芽細胞を各wellの中央にシリコーン樹脂製のストッパーがセットされた96-well マルチプレートに、上記2項に従って培養後、ストッパーを除去して各種遊走刺激

因子で刺激した。刺激 38 時間後に全細胞をカルセインによって染色し、遊走細胞面積を定量解析した。

5. **タイムラプス撮影**：歯根膜線維芽細胞を Cellomics Array Scan VTI (Thermo Fisher Scientific) を用いて PDGF-BB で刺激し、検出域に遊走した細胞を明視野で 10 frame/sec の間隔で 38 時間後まで連続撮影した。
6. **細胞接着因子とECMに関連する遺伝子発現解析**：歯根膜線維芽細胞を PDGF-BB で刺激し、結果 2 にて細胞遊走を開始した 8 時間後に回収した全 RNA から cDNA を合成し、細胞接着因子と ECM の発現を Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array (84 因子, Qiagen) を用いて網羅的に解析した。解析精度が高いと判断された遺伝子のうち、遺伝子発現量が PDGF-BB 刺激で 2 倍以上増加した integrin 遺伝子とそのリガンドである ECM については、リアルタイム RT-PCR 法にて追試した。
7. **免疫蛍光染色**：歯根膜線維芽細胞を PDGF-BB で刺激し、ゴルジ体、integrin $\alpha 3$ と $\alpha 5$ 、これらのリガンドである fibronectin と vitronectin を染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察した。
8. **インテグリン作用の阻害**：integrin $\alpha 3$ と $\alpha 5$ の中和抗体と特異的に integrin $\alpha 3$ を阻害する阻害ペプチド ($\alpha 325$) を使用した。歯根膜線維芽細胞と Ca9-22 細胞へ、播種 10 時間後に、各試薬を添加した。
9. **統計解析**：3 群間以上の差の検定には one-way analysis of variance (one-way ANOVA)、多重比較検定を Tukey-Kramer test を用いた。p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. **細胞遊走に効果的な遊走刺激因子**：細胞障害性を示さなかった TGF- $\beta 1$ (10 ng/mL)、BMP-2 (100 ng/mL)、PDGF-BB (10 ng/mL)、FGF-2 (10 ng/mL)、および SDF-1 (100 ng/mL) を用いて刺激を行い、細胞遊走面積を比較したところ、PDGF-BB 刺激群において 2.5 倍細胞遊走面積が増加した。従って今後は PDGF-BB を陽性対照として用いた。
2. **PDGF-BB 刺激時の細胞遊走**：撮影 8 時間後に細胞遊走は開始し、38 時間後まで細胞遊走が顕著に多かった。
3. **細胞遊走時に発現する細胞接着因子と ECM の遺伝子発現**：integrin $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ は無刺激群と比較して約 2 倍ほど遺伝子発現量が増加した。一方、これらのリガンドである collagen, type I, $\alpha 1$ と fibronectin 1 の遺伝子発現量は変化しなかった。
4. **細胞遊走時の integrin $\alpha 3$ と $\alpha 5$ の細胞内局在の変化**：ゴルジ体が核の前方に移動した細胞は、その移動方向に細胞が扇型に変形した。integrin $\alpha 3$ は遊走細胞の細胞端で、integrin $\alpha 5$ はその内方で発現した。integrin $\alpha 3$ のリガンドである vitronectin は細胞質周囲で、integrin $\alpha 5$ のリガンドである fibronectin は遊走細胞周囲で発現した。
5. **integrin $\alpha 3$ と $\alpha 5$ の阻害が細胞遊走に及ぼす影響**：PDGF-BB 刺激下で integrin $\alpha 5$ を阻害すると細胞遊走面積は減少した。一方、integrin $\alpha 3$ は PDGF-BB 刺激を行わずとも、PDGF-BB と同等に細胞遊走面積が増加した。また、 $\alpha 325$ は Ca9-22 細胞の細胞遊走面積を変化させなかった。

【考察】

本研究において、歯根膜線維芽細胞の遊走時に発現する integrin $\alpha 3$ と integrin $\alpha 5$ は異なる部位で発現し、細胞遊走へ相反する影響を及ぼした。PDGF-BB 刺激下の fibronectin の染色強像はより明瞭に得られたこと、integrin $\alpha 5$ の中和抗体を用いて阻害すると遊走能が抑制されたことから、歯根膜線維芽細胞における integrin $\alpha 5$ を介した歯根膜線維芽細胞の遊走には fibronectin が重要であると考えられる。また、integrin $\alpha 3$ と細胞膜上で結合しているウロキナーゼ受容体にウロキナーゼが結合することを阻害するペプチドである $\alpha 325$ は、間接的に integrin $\alpha 3$ の働きを阻害するものであることから、integrin $\alpha 3$ が細胞遊走に抑制的に働くメカニズムにはウロキナーゼと vitronectin が関与している可能性が示唆された。そして、integrin $\alpha 3$ の阻害ペプチドは、歯肉上皮由来細胞の遊走能には影響を与えなかった点からも、歯周組織の再生において重要となる上皮細胞の深部増殖を抑制し、結合組織性付着を獲得するために有効である可能性が示された。

【結論】

歯根膜線維芽細胞が遊走時に発現するインテグリンは $\alpha 3$ と $\alpha 5$ であり、インテグリン $\alpha 3$ は歯膜細胞の遊走を抑制し、インテグリン $\alpha 5$ は遊走を促進する。

論文審査結果の要旨

歯根膜は、結合組織付着によるメカニカルな防御機能に加えて、多分化能を有する幹細胞の供給源としての機能を有し、歯周組織の恒常性維持や再生に重要な役割を果たす。これらの機能を発揮するためには歯根面への歯根膜線維芽細胞の遊走と接着が必要であるが、その制御メカニズムは未だ不明な点が多い。細胞と細胞周囲の微小環境との相互作用は細胞遊走・接着の制御に重要であり、種々の細胞外基質（extracellular matrix：ECM）とインテグリンとの接着が細胞遊走の誘導に関与すると考えられる。本研究では、歯根膜線維芽細胞が遊走時に発現するインテグリンサブユニットの解明と、さらにインテグリン発現の選択的制御が遊走能に与える影響を検討した。実験にはヒト抜去歯から培養した歯根膜線維芽細胞（岡山大学研究倫理審査委員会：承認番号2070）と歯肉上皮由来細胞株（Ca9-22）を、mitomycin Cを培地に添加して細胞増殖を阻害した状態で行った（結果1）のみはmitomycin C無添加）。得られた結果は以下の通りである。

- 1) **細胞遊走に効果的な遊走刺激因子**：既報に基づき種々の細胞遊走刺激因子を用いて刺激し、38時間後に細胞遊走面積を比較したところ、platelet-derived growth factor-BB（PDGF-BB：10 ng/mL）が最も高い遊走効果を示した。
- 2) **PDGF-BB刺激時の細胞遊走**：タイムラプス撮影を行い細胞遊走の状況を観察したところ、撮影8時間後に細胞遊走は開始した。
- 3) **細胞遊走時に発現する細胞接着因子とECMの遺伝子発現**：PDGF-BBによる刺激8時間後に歯根膜線維芽細胞が発現する細胞接着因子とECMの遺伝子プロファイル（84因子）をPCRアレイによって解析したところ、integrin $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ と $\alpha 5$ は無刺激群と比較して遺伝子発現が約2倍増加した。一方、これらのリガンドであるcollagen, type I, $\alpha 1$, fibronectin 1およびvitronectinの遺伝子発現量は変化しなかった。
- 4) **細胞遊走時のintegrin $\alpha 3$ と $\alpha 5$ の細胞内局在の変化**：上記で同定したintegrin $\alpha 3$ と $\alpha 5$ について、遊走細胞を蛍光免疫染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察した。integrin $\alpha 3$ は遊走細胞の細胞端で、integrin $\alpha 5$ はその内方で発現した。integrin $\alpha 3$ のリガンドであるvitronectinは細胞質周囲で、integrin $\alpha 5$ のリガンドであるfibronectinは遊走細胞周囲で発現した。
- 5) **integrin $\alpha 3$ と $\alpha 5$ の阻害が細胞遊走に及ぼす影響**：integrin $\alpha 3$ と $\alpha 5$ の中和抗体とintegrin $\alpha 3$ の阻害ペプチド（ $\alpha 325$ ）の刺激による細胞遊走の変化を検討した。PDGF-BB刺激下でintegrin $\alpha 5$ を阻害すると歯根膜線維芽細胞の細胞遊走面積は減少した。一方で、integrin $\alpha 3$ の阻害はPDGF-BB刺激を行わずとも、PDGF-BBと同等に細胞遊走面積を増加した。また、 $\alpha 325$ はCa9-22細胞の細胞遊走面積を変化させなかった。

以上のことから、歯根膜線維芽細胞の遊走時に発現するintegrin $\alpha 3$ は遊走を抑制し、integrin $\alpha 5$ は遊走を促進することが明らかになった。さらに、integrin $\alpha 3$ 中和抗体と $\alpha 325$ は、PDGF-BBと同等の細胞遊走促進効果を示すことが分かった。 $\alpha 325$ はintegrin $\alpha 3$ と細胞膜上で結合しているウロキナーゼ受容体にウロキナーゼが結合することを阻害し、間接的にintegrin $\alpha 3$ の働きを阻害することから、integrin $\alpha 3$ が細胞遊走に抑制的に働くメカニズムにはウロキナーゼとvitronectinが関与している可能性が示唆された。本研究で得られた結果は、歯根膜線維芽細胞における特異的な細胞遊走メカニズムの解明の一助となり、今後の歯科医療の発展に貢献するものである。

よって、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た。