

|             |         |          |
|-------------|---------|----------|
| 指 導 教 授 氏 名 | 指 導 氏 名 | 役 割      |
| 印           |         | 研究の総括的指導 |
| 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  | 歯周病態学分野 | 身分 | 大学院生 | 氏名 | 河村 麻理 |
| 論文題名 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   |         |    |      |    |       |
| <p><b>【緒言】</b></p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p><b>【材料と方法】</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li><b>1. 試薬:</b> 細胞遊走刺激因子として、transforming growth factor-<math>\beta</math>1 (TGF-<math>\beta</math>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。</li> <li><b>2. 細胞の分離・培養:</b> 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%、CO<sub>2</sub>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<math>3.75 \times 10^4</math> cells/cm<sup>2</sup>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 <math>\mu</math>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。</li> <li><b>3. 細胞活性試験:</b> 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。</li> <li><b>4. 細胞遊走試験:</b> 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。</li> </ol> |         |    |      |    |       |

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。