

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19592134
 研究課題名（和文） 歯肉付着上皮の接着・細胞移動の分子機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of cell adhesion and cell migration in gingival junctional epithelium.

研究代表者

下野 正基（SHIMONO MASAKI）
 東京歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号：00085771

研究成果の概要（和文）： 健康な歯肉では、付着上皮細胞が内側基板を介して、細胞外マトリックスと接着タンパクによりエナメル質に接着している。この研究は、正常および再生過程の歯肉付着上皮における、細胞外マトリックスの laminin γ_2 や、接着蛋白の integrin β_4 、integrin α_3 の発現を検討し、歯周組織の創傷治癒のメカニズムや、エナメル表面での付着上皮細胞の遊走機序を明らかにする目的で行った。実験の結果から、付着上皮の再生過程および長い付着上皮の短小化に、内側基板とエナメル質表面の界面における laminin γ_2 の分泌と integrin $\alpha_6\beta_4$ による接着、そして integrin $\alpha_3\beta_1$ の発現による細胞移動が、きわめて重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study was, examine the expression of laminin γ_2 , integrin β_4 and integrin α_3 in the normal and regenerating gingival junctional epithelium in order to understand the mechanism of wound healing and function of cell migration. Our results suggest that secretion of laminin γ_2 in the connective tissue may induce epithelial cell migration, and that binding of laminin γ_2 to integrin $\alpha_6\beta_4$ and integrin $\alpha_3\beta_1$ in the IBL may provoke cell adhesion and migration of cells facing the tooth on the enamel surface of the regenerating junctional epithelium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード： 付着上皮、実験的歯周炎、細胞接着、細胞移動、内側基底板、laminin γ_2 、integrin β_4 、integrin α_3

1. 研究開始当初の背景

健康な歯肉付着上皮は、歯の表面と強固な接着を形成することにより、歯周組織を外部環境のさまざまな侵襲から守っている。付着上皮は初期には退縮エナメル上皮によってつくられるが、口腔上皮からの細胞の遊走によって常に新しい細胞に置き換わっている。また、付着上皮とエナメル質の間には内側基底板、歯肉結合組織との間には外側基底板があり、エナメル質と歯肉結合組織とを付着させている。

歯肉付着上皮では、DAT 細胞 (cells directly attached to the tooth) とよばれる最表層の付着上皮細胞が内側基底板を介して、laminin-5 (γ_2) などの細胞外マトリックスと integrin $\alpha_6\beta_4$ などの接着タンパクによりエナメル質に接着しているといわれているが、上皮のターンオーバーに伴うエナメル表面の DAT 細胞の移動については明らかとなっていない。さらに、長い付着上皮や歯肉切除後の再生過程において、接着蛋白や細胞外マトリックスがどのように発現し機能するのかについても、不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 歯肉切除後の再生過程や、長い付着上皮の短小化に、細胞外マトリックスの laminin γ_2 や、接着蛋白の integrin β_4 、integrin α_3 が、どのように関わるかを明らかにする。

(2) エナメル表面での歯肉上皮細胞の細胞移動に、これらの laminin γ_2 や、接着蛋白の integrin β_4 、integrin α_3 がどのように発現し機能するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ICR マウスの付着上皮における laminin γ_2 、integrin β_4 、integrin α_3 の mRNA 発現を、laser microdissection 法により定量的 RT-PCR により解析した。

(2) 口蓋側歯肉を切除後、1, 3, 5, 7, 14 日後の歯周組織の再生と付着上皮の再接着過程におけるこれらの発現を、川本方による非脱灰新鮮標本を用いた共焦点レーザー顕微鏡により検討した。

(3) Sprague-Dawley 雄ラットの臼歯部歯間へのゴム片挿入による実験的歯周炎の修復過程においても、同様の検討を行った。

(4) Sprague-Dawley 雄ラットの口腔粘膜より得られた培養細胞を用いて、細胞層を線状に除去した後の上皮再生過程を観察し wound-healing assay により、laminin γ_2 、integrin β_4 、integrin α_3 の発現を共焦点レーザー顕微鏡により検討した。

4. 研究成果

(1) マウス付着上皮における laminin γ_2 、integrin β_4 、integrin α_3 の局在と発現を、laser microdissection 法により DAT 細胞、付着上皮の基底細胞、歯肉溝上皮細胞に分けて収集し、定量的 real-time PCR により解析した結果、DAT 細胞において laminin γ_2 、および integrin α_3 の高い発現がみられた。さらに、付着上皮細胞の BrdU ラベリングの結果、DAT 細胞のセメント-エナメル境 (CEJ) 部から歯冠側への細胞移動が示された。このことから、付着上皮の DAT 細胞が laminin γ_2 を介してエナメル質表面に強く接着すると共に、integrin α_3 により歯冠側へと移動することが明らかとなった (J. Periodont. Res., 2009)。

(2) 川本法による歯および顎骨の非脱灰切片をもちいて、歯肉切除後の再生過程および長い付着上皮における laminin γ_2 、integrin β_4 、integrin α_3 の局在と発現を免疫蛍光染色の共焦点レーザー顕微鏡観察を行い、歯肉切除後の再生過程に形成される長い付着上皮においても、正常な付着上皮と同様に、免疫蛍光染色共焦点レーザー顕微鏡観察により、laminin γ_2 、integrin β_4 、integrin α_3 の局在が、結合組織側の外側基底板と、エナメル側の内側基底板に限局して強く線状に発現していた。このことから、長い付着上皮にみられる DAT 細胞に相当する再生付着上皮細胞が、正常の付着上皮と同様に、laminin γ_2 を介してエナメル質表面に強く接着すると共に、integrin α_3 により歯冠側へと移動することが明らかとなった (J. Periodont. Res., 2009)。

(3) ラット口腔粘膜培養細胞の上皮再生過程における wound-healing assay では、laminin γ_2 が創部側の細胞辺縁部に強く発現するのに対して、integrin β_4 は後方の細胞突起部にみられた。一方、細胞伸展に関与する integrin α_3 の発現は、創部側の細胞突起の細胞膜に強く発現していた。

これらの結果は、上皮の再生過程および長い付着上皮の短小化に、内側基底板とエナメル質表面の界面における laminin γ_2 による接着と、integrin α_3 による細胞移動が、きわめて重要な役割を担うことを示唆していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計14件)

1. Sasaki H., Muramatsu T., Kwon H J., Yamamoto H., Hashimoto S., Jung H S., Shimono M.
Down-regulated Genes in Mouse Dental Papillae and Pulp.
Journal of Dental Research, 有り, 2010, In Print
2. Sato K., Muramatsu T., Tsuchiya Y., Masaoka T., Enokiya Y., Hashimoto S., Shimono M.
Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation.
Oral Diseases, 有り, 16, 2010, 263-268
3. Sugisawa M., Masaoka T., Enokiya Y., Muramatsu T., Hashimoto S., Yamada S., Shimono M.
Expression and function of laminin and integrins on adhesion/migration of primary culture cells derived from rat oral epithelium.
Journal of Periodontal Research, 有り, 45 (2), 2010, 284-291
4. Tsumura M., Okumura R., Tatsuyama S., Ichikawa H., Muramatsu T., Matsuda T., Baba A., Suzuki K., Kajiya H., Sahara Y., Tokuda M., Momose Y., Tazaki M., Shimono M., Shibukawa Y.
Ca²⁺ Extrusion via Na⁺-Ca²⁺ Exchangers in Rat Odontoblasts.
Journal of Endodontics, 有り, 36 (4), 2010, 668-674
5. Okumura R., Shibukawa Y., Muramatsu T., Hashimoto S., Nakagawa K., Tazaki M., Shimono M.
Sodium-Calcium Exchangers in Rat Ameloblasts.
Journal of Pharmacological Sciences, 有り, 112 (2), 2010, 223-230
6. Masaoka T., Hashimoto S., Kinumatsu T.,

- Muramatsu T., Jung H S., Yamada S., Shimono M.
Immunolocalization of laminin and integrin in regenerating junctional epithelium of mice after gingivectomy.
Journal of Periodontal Research, 有り, 44 (4), 2009, 489-495
7. Tsuchiya Y., Muramatsu T., Masaoka T., Hashimoto S., Shimono M.
Effect of the dental adhesive, 4-META/MMA-TBB resin, on adhesion and keratinization of regenerating oral epithelium.
Journal of Periodontal Research, 有り, 44 (4), 2009, 496-502
8. Kinumatsu T., Hashimoto S., Muramatsu T., Sasaki, H., Jung H S., Yamada S., Shimono M.
Involvement of laminin and integrins in adhesion and migration of junctional epithelium cells.
Journal of Periodontal Research, 有り, 44 (1), 2009, 13-20
9. Hosoya A., Lee J M., Cho S W., Kim J Y., Shinozaka N., Shibahara T., Shimono M., Jung H S.
Morphological evidence of basal keratinocyte migration during the re-epithelialization process.
Histochemistry and Cell Biology, 有り, 130 (6), 2008, 1165-1175
10. Muramatsu T., Saitoh M., Ro Y., Uekusa T., Iwamura E., Ohta K., Kohno Y., Abiko Y., Shimono M.
Inhibition of syndecan-1 expression and function in oral cancer cells.
Oncology Reports, 有り, 20 (6), 2008, 1353-1357
11. Muramatsu T., Uekusa T., Masaoka T., Saitoh M., Hashimoto S., Abiko Y., Jung H S., Shimono M.
Differential expression and localization of connexins 26 and 43 in the rat gingival epithelium.
Archives of Histology and Cytology, 有り, 71 (3), 2008, 147-154
12. Hoshino M., Hashimoto S., Muramatsu T., Matsuki M., Ogiuchi H., Shimono M.
Claudin rather than occludin is essential for differentiation in rat incisor odontoblasts.

Oral Diseases, 有り, 14 (7), 2008, 606-612

13. Lee M W., Muramatsu T., Uekusa T., Lee J H., Shimono M.

Heat stress induces alkaline phosphatase activity and heat shock protein 25 expression in cultured pulp cells.

International Endodontic Journal, 有り, 41 (2), 2008, 158-162

14. Chung C K., Muramatsu T., Uekusa T., Sasaki H., Shimono M.

Inhibition of connexin 43 expression and function in cultured rat dental pulp cells by antisense oligonucleotide.,

Cell Tissue Research, 有り, 329 (2), 2007, 295-300

〔学会発表〕(計8件)

1. 杉澤幹雄, ラット口腔粘膜初代培養細胞の接着・遊走における laminin- γ 2、integrin- β 4、integrin- α 3の発現
秋季歯周病学会学術大会, 2008年9月, 四日市市

2. 正岡孝康, ラットの長い付着上皮における laminin- γ 2、integrin- β 4、integrin- α 3の免疫局在
歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2008年9月, 東京

3. Masaoka Takayasu, Immunolocalization of laminin and integrin in junctional epithelium after gingivectomy
86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008年7月, Toronto

4. 杉澤幹雄, ラット口腔粘膜初代培養細胞の接着・遊走における laminin- γ 2、integrin- β 4、integrin- α 3の発現
日本歯周病学会 50周年記念大会, 2007年9月, 東京

5. 正岡孝康, 歯肉切除後のマウス再生付着上皮における laminin- γ 2、integrin- β 4の免疫局在
日本再生歯科医学会学術大会および総会, 2007年9月, 東京

6. 杉澤幹雄, ラット口腔粘膜初代培養細胞の接着・遊走における laminin- γ 2、integrin- β 4、integrin- α 3の発現
日本再生歯科医学会学術大会および総会, 2007年9月, 東京

7. 杉澤幹雄, ラット口腔粘膜初代培養細胞の接着・遊走における laminin- γ 2、

integrin- β 4、integrin- α 3の発現
東京歯科大学学会総会, 2007年8月, 千葉市

8. 土谷穂史, 歯肉切除後の再生における4-META/MMA-TBBレジンの影響
東京歯科大学学会総会, 2007年8月, 千葉市

〔図書〕(計6件)

1. 下野正基監修 小学館 東京
ホーム・メディカ・ブックス・ビジュアル版
「歯周病予防と口腔ケア」, 2009, 159

2. 小学館・ホームメディカ編集委員会 編集
下野正基著分担, 小学館 東京
新版ホームメディカ家庭医学大事典, 2008,
1197-1242

3. 下野正基、高田 隆編集, 医歯薬出版,
東京
新口腔病理学, 2008, 367

4. 朔 敬、下野正基、高田 隆、武田泰典,
医歯薬出版, 東京
新歯科衛生士教本 病理学 第2版, 2008,
247

5. 高橋敬人、斉藤秋人、下野正基、橋本貞充、杉澤幹雄、正岡孝康、衣松高志、山田 了、黒田昌彦
歯界展望, 東京
“長い上皮性付着”は本当に不安定な治癒像か?
接着タンパクにより明らかになってきた、付着上皮の接着と移動のメカニズム, 2007,
413-438

6. 鴨井久一、花田伸行、佐藤 勉、野村義明編集 下野正基 著分担
医歯薬出版, 東京
Preventive Periodontology プリベンティブペリオドントロジー
臨床を支えるサイエンスを知る・唾液検査を活用する・生活習慣病を予防する, 2007,
7-20/373

6. 研究組織
(1)研究代表者
下野 正基 (東京歯科大学・歯学部・教授)
研究者番号: 00085771

(2)研究分担者
橋本 貞充 (東京歯科大学・歯学部・准教授)
研究者番号: 10201708

村松 敬 (東京歯科大学・歯学部・講師)
研究者番号: 00276982

(3) 研究協力者

正岡 孝康 (東京歯科大学・歯学部)

杉澤 幹雄 (東京歯科大学・歯学部)

土谷 穂史 (東京歯科大学・歯学部)