

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24128

研究課題名（和文）歯周組織における上皮-免疫細胞間の連携によるバリア機能構築メカニズムの解析

研究課題名（英文）Elucidating the mechanism of barrier function construction by coordination of epithelium and immune cells of periodontal tissue

研究代表者

池崎 晶二郎（Ikezaki, Shojiro）

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：00849276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：セマフォリンは神経軸索ガイダンス因子であるが、上皮細胞や免疫細胞においても発現していることが知られている。我々は、付着上皮と免疫細胞のそれぞれが発現するセマフォリンが連携することで付着上皮のバリア機構を構築しているのではないかと考えた。本研究では付着上皮においてSemaphorin4Aおよびその受容体であるPlexinB2が発現していることを確認した。また、マウス樹状細胞においてもSema4Aは発現していることから、上皮細胞と免疫細胞それぞれが発現するセマフォリンがオートクライン的に作用し、上皮バリアを構築している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織において外界とのバリアを構成する付着上皮と免疫細胞の関係性について不明な点が多い。本研究で得られた結果では、付着上皮および免疫細胞が共通の分子を介して歯周組織の構造を維持している可能性を示唆した。また、作成を行った付着上皮細胞株はin vitroで歯周病病態形成の解析、治療法を開発するためのツールになると期待される。

研究成果の概要（英文）：The junctional epithelium is a structure that adheres to the enamel and separates the external and internal environment of the periodontal tissue. Semaphorins are known to be expressed in epithelial cells and immune cells as well as in nerve axon guidance factors. Since we have shown that semaphorin-mediated signaling plays a role in the differentiation of ameloblasts, the origin of the junctional epithelium, we hypothesized that semaphorin expressed by junctional epithelium and immune cells may cooperate to establish a barrier mechanism in the junctional epithelium.

In this study, we confirmed the expression of Semaphorin4A and its receptor PlexinB2, in the junctional epithelium. Semaphorin4A was also expressed in dendritic cells derived from mouse bone marrow cells, suggesting that semaphorins expressed by epithelial cells and immune cells act in an autocrine manner to construct the epithelial barrier.

研究分野：口腔組織・発生学

キーワード：付着上皮 セマフォリン 上皮細胞 免疫細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯を支持する歯肉および歯周組織の炎症と歯槽骨の吸収を伴う慢性感染症である。日本国内では約 330 万人が罹患していると言われており、糖尿病や心・脳血管疾患等との全身疾患との関連性が知られてきており、社会的に関心の高いトピックである。

付着上皮は歯肉溝の底部に位置しており、エナメル質と接着することで物理的な防御機構を構築し、さらに歯周病原菌などの細菌の侵入に対しては自然免疫応答を起し様々なサイトカイン(インターロイキン(IL)-1, IL-8, TNF- )などを産生することで炎症細胞を活性化することが知られている。付着上皮は、エナメル質形成の役割を終えた縮合エナメル上皮と口腔上皮の癒合により形成される。他の歯肉上皮と比較して付着上皮は細胞間隙が広く開大し、ターンオーバーのサイクルが早く、この特徴が病原菌の侵襲に対する防御機構の一つとして重要な役割を担っていると考えられる。しかし、付着上皮において細胞が細胞間接着装置を維持するメカニズムについて不明な点が多い。

Semaphorin は神経軸索ガイド因子であるが、神経系以外にも消化器系、免疫系の細胞での発現が解析されており様々な炎症性疾患との関与が知られている(日本臨床免疫学会会誌 37(1), 1-10, 2014)。我々のグループは以前に Semaphorin を介したシグナル系がエナメル上皮細胞の分化と細胞間接着装置の機能亢進に働いていることを報告した(J Bone Miner Res. Nov;31(11):1943-1954 2016)。エナメル上皮を由来とする付着上皮においても、Semaphorin を介したシグナルが上皮バリアの構築に関与しているのではないかと考えた。

一方で、Semaphorin は T 細胞や樹状細胞などの免疫細胞においても Rho シグナルを活性化することで分化を制御していることが知られていることから、Semaphorin を介した上皮細胞-免疫細胞の連携による歯周組織のバリアシステム構築を推測した。

## 2. 研究の目的

付着上皮が歯周組織において重要なバリア機構を担っていることは解剖学的位置、特徴から推察することができるが、その構造を維持するための分子メカニズムについては依然として不明な点が多い。

神経軸索ガイド因子である Semaphorin が付着上皮の由来であるエナメル上皮に発現し、細胞の分化・形態維持に働いていることはすでに分かっている(J Bone Miner Res. Nov;31(11):1943-1954 2016)。また、免疫担当細胞の分化の制御(Immunity 13, 633-642, 2000) ,さらには骨芽細胞に対して骨形成を抑制的に制御する(Nat Med 17 1473-1480, 2011)などの報告もある。歯周病の病態形成においては歯周組織の様々な細胞が発現する Semaphorin が重要な役割を担っていると推測できる。そのような経緯から、「歯周組織において上皮細胞と免疫担当細胞は Semaphorin を介した連携によりバリアを構築しているのではないか」という仮説を立てた。

本研究の目的は Semaphorin を介して上皮細胞と免疫担当細胞間が連携するメカニズムを明らかにして、歯周組織のバリア機能を高めることによって歯周病の発症の予防ならびに治療法の開発に活かすことである。

## 3. 研究の方法

1) マウス付着上皮組織における Semaphorin 分子およびその受容体の発現を明らかにする。  
 生後 20 日齢のマウスを安楽死させ、臼歯部の組織切片を作成した。免疫組織染色により付着上皮におけるセマフォリンおよびその受容体の発現を解析した。

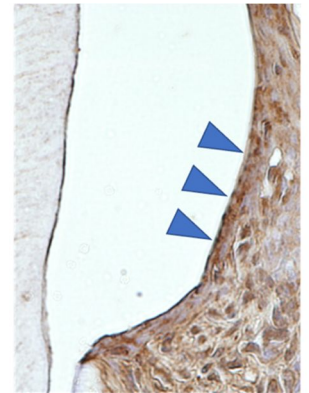


図1. 付着上皮(矢頭)に PlexinB2の発現を認めた。

2) マウス付着上皮細胞株を作成する。

上皮細胞特異的に蛍光タンパクを発現するトランスジェニックマウス (K14Cre;tdTomato)より臼歯を抜去しエナメル質表面に付着した上皮組織の分離・培養を行った。培養細胞はシングルセルクローニングを行い、候補株を作成した。アパタイトに対する接着能・接合上皮マーカー分子の発現を RT-qPCR および免疫細胞染色により候補とする株の評価を行った。

#### 4. 研究成果

1) マウス付着上皮における Semaphorin の発現。

マウス付着上皮においては Semaphorin4A とその受容体である PlexinB2 の発現を認めた。また、マウス骨髄細胞から GM-CSF(顆粒球単球コロニー刺激因子)により分化誘導させた樹状細胞では Semaphorin4A が発現していることが分かった。付着上皮における上皮構造の維持には複数の細胞が発現する Semaphorin が関与していることが示唆された。

2) マウス付着上皮細胞の作成。

*in vitro*における付着上皮細胞 - 免疫細胞の連携によるバリア機構解析のため、マウス付着上皮細胞の作成を行った。K14Cre;tdTomato マウスを用い、実体蛍光顕微鏡観察下でエナメル質に付着する tdTomato 陽性上皮組織を回収し、培養を行った(図 2)。

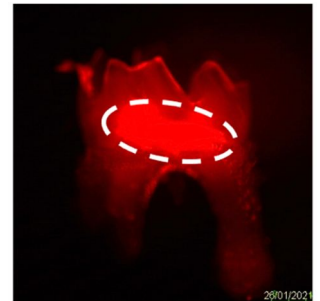


図2 マウス抜去歯より、エナメル質に接着するtomato陽性上皮組織(付着上皮)を回収した。

培養細胞は付着上皮において発現することが知られている ODAM(Odontogenic ameloblast-associated protein)などの分子の発現を免疫染色法により確認した。今後は定量 PCR 法やウエスタンブロッティングを用いて分子の発現解析を行っていく予定である。作成した付着上皮細胞株は上皮-エナメル質接着によるバリア構築メカニズムを *in vitro*で解析するためのツールになると期待される。

3)成果のまとめ

研究成果 1)で得られた結果より、Semaphorin4A の発現はマウス付着上皮組織と樹状細胞において共通していることが分かった。それぞれの発現する Semaphorin が協調することで上皮組織のバリア構造を維持している可能性が示唆された(図 3)。

付着上皮は細胞のターンオーバーの速さや細胞間隙の広さなど他の粘膜組織と比較して特徴的な上皮バリア構造をもつことで、外部からの刺激に反応・防御していると考えられるが、Semaphorin を介した免疫細胞との連携による上皮バリア構築メカニズムのアイデアは画期的であり、歯周病の予防法・治療法の開発アイデアになると期待できる。

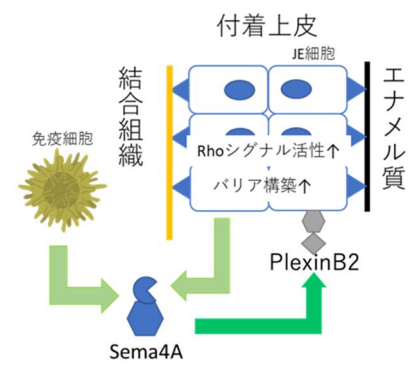


図.3 Sema4Aを介した付着上皮のバリア構築仮説

また、付着上皮をターゲットとした研究は行われているもののこれまでに細胞株を作成し付着

上皮細胞のもつ独特の細胞特性の解析を *in vitro* で行った研究は行われていない。

その機能マウス付着上皮細胞株作成により、付着上皮とエナメル質の接着による物理的バリア・付着上皮との関連細胞の連携による免疫的バリアについて *in vitro* での解析ができるツールになると考えられる。具体的な今後の展望として、ハイドロキシアパタイトに対する接着タンパクの発現を付着上皮細胞株に誘導し、付着上皮組織との接着を増強する方法を探索していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池崎 晶二郎
2. 発表標題 マウス付着上皮細胞培養法と細胞株樹立
3. 学会等名 第90回 岩手医科大学歯学会 例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------