

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463134

研究課題名(和文) インテグリンの活性制御による歯周組織幹細胞の遊走促進：分子リガンド創製への展開

研究課題名(英文) Induction of Migration of Periodontal Ligament Cells by Selective Regulation of Integrin Expression

研究代表者

山本 直史 (Yamamoto, Tadashi)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：50432662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜細胞は、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としての機能を有することから、歯根膜細胞の欠損部位への遊走は歯周組織の恒常性維持や再生に重要な役割を果たす。本研究で、Integrin α 3は歯根膜細胞の遊走を抑制し、integrin α 5は遊走を促進することが明らかになった。とりわけ、integrin α 3阻害剤が歯根膜細胞の遊走促進に有効であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Periodontal ligament cells (PDLs) are multipotent cells that can differentiate into osteogenic cells. It is necessary to induce migration of PDLs for regeneration and homeostasis of periodontal tissue. Cell migration is regulated by local microenvironment, defined by coordination between soluble factors and extracellular matrix (ECM). Integrin-mediated cell adhesion to ECM provides essential signals for cell migration. To determine adhesion molecules responsible for migration of PDLs, we examined expression profiles of integrin and ECM, and the integrin isoform-specific regulation of migration of PDLs. The array analysis indicated that mRNA of integrin α 2, α 3, α 4, and α 5 were increased in migrating PDLs. Anti-integrin α 3 antibody and blocking peptides significantly increased migration of PDLs, conversely anti-integrin α 5 antibody decreased. Therefore, specific inhibition of integrin α 3 may be useful to induce migration of PDLs during regeneration of periodontal tissue.

研究分野：歯周病学，歯周治療系歯学，歯周再生医学

キーワード：インテグリン 細胞遊走 歯根膜 歯周組織

1. 研究開始当初の背景

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することから、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起点となるのが歯根面への歯根膜細胞の遊走と接着であるが、その制御メカニズムは複雑で未だ不明な点が多く、関与するシグナル分子の発現動態の解明が必要である。

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。近年、細胞種特異的なインテグリン発現の制御は、様々な疾病治療のための標的分子として注目されている。すなわち、インテグリンサブユニットの選択的制御によって、歯根膜細胞の遊走を促進し得るという着想に至った。

2. 研究の目的

歯根膜細胞の遊走を制御する細胞接着分子を解明し、それらの発現制御によって歯根膜細胞の遊走を促進することを目的に、歯根膜細胞が遊走時に発現する ECM とインテグリンサブユニットのプロファイルを調べ、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。

3. 研究の方法

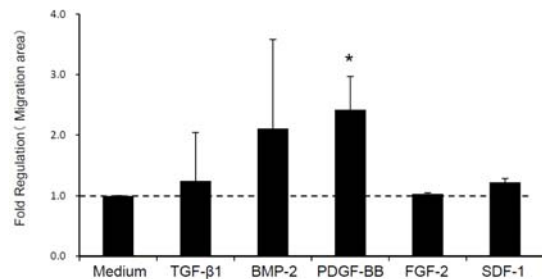
- (1) ヒト抜去歯から分離した歯根膜細胞 (岡山大学研究倫理審査委員会: 承認番号 2070) とヒト歯肉由来細胞 (Ca9-22 細胞) を、血清濃度 0.1 % の培地で 24 時間培養後に mitomycin C によって細胞増殖を阻害し、種々の細胞遊走因子で刺激した。
- (2) 細胞遊走刺激因子として、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) および platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) を用いた。
- (3) 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) 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 Image J software を用いて定量解析した。
- (5) 遊走開始 8 時間後に歯根膜細胞が発現する細胞接着因子と ECM の遺伝子プロフ

ファイル (84 因子) を PCR アレイ (Qiagen: Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array) を用いて網羅的に解析した。無刺激群と比較して 2 倍以上の発現変化を示すインテグリンサブユニットと、それらのリガンド ECM については、リアルタイム RT-PCR 法にて追試し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた免疫染色法によって蛋白発現を調べた。

- (6) 上記で同定した integrin α 3 と α 5 の中和抗体と integrin α 3 の阻害ペプチド (Wei *et al*, *Mol Biol Cell*, 2001) の刺激による細胞遊走の変化を調べた。

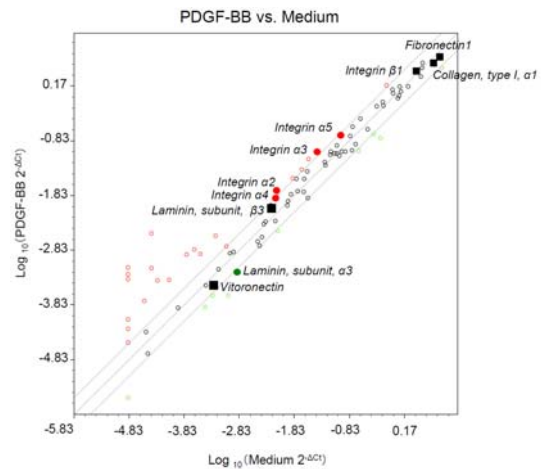
4. 研究成果

(1) 細胞遊走に効果的な遊走刺激因子



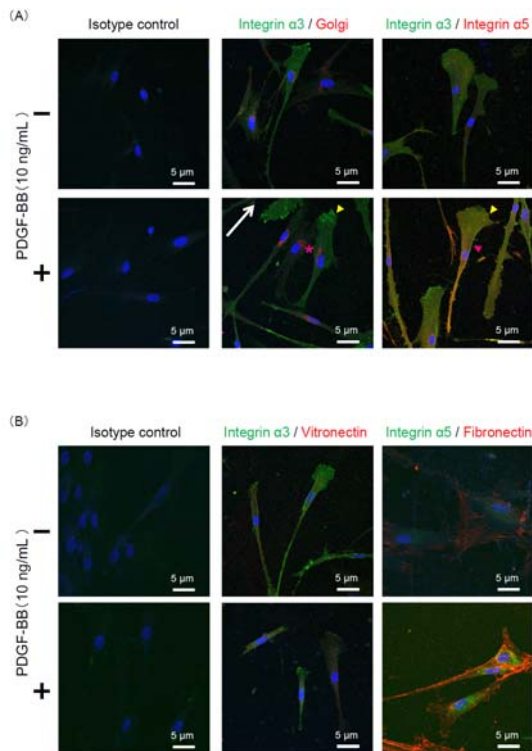
MTS アッセイにおいて細胞障害性を示さなかった TGF- β 1 (10 ng/mL), BMP-2 (100 ng/mL), PDGF-BB (10 ng/mL), FGF-2 (10 ng/mL), および SDF-1 (100 ng/mL) を用いて刺激を行い、細胞遊走面積を比較したところ、PDGF-BB 刺激群において 2.5 倍細胞遊走面積が増加した。従って以降の実験では PDGF-BB (10 ng/mL) を陽性対照として用いた。

(2) 細胞遊走時に発現する細胞接着因子と ECM の遺伝子発現



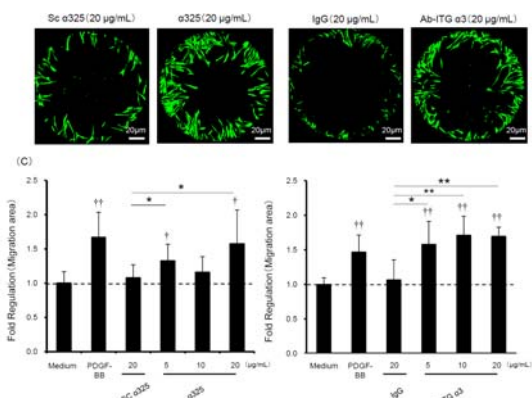
Integrin α 2, α 3, α 4, α 5 の遺伝子発現量は、無刺激群と比較して約 2 倍増加した。一方、これらのリガンド ECM である collagen type I α 1, fibronectin 1, および vitronectin の遺伝子発現量は変化しなかった。

(3) 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遊走細胞は、その移動方向に細胞が扇型に変形した。Integrin $\alpha 3$ の蛋白発現は遊走する歯根膜細胞の細胞質端で、integrin $\alpha 5$ はその内方で発現した (A)。一方、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 (B)。

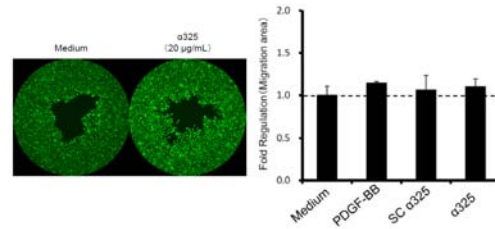
(4) integrin $\alpha 3$ と $\alpha 5$ の阻害が細胞遊走に及ぼす影響



PDGF-BB 刺激下で integrin $\alpha 5$ 中和抗体を用いて integrin $\alpha 5$ を阻害すると歯根膜細胞の遊走面積は減少した。

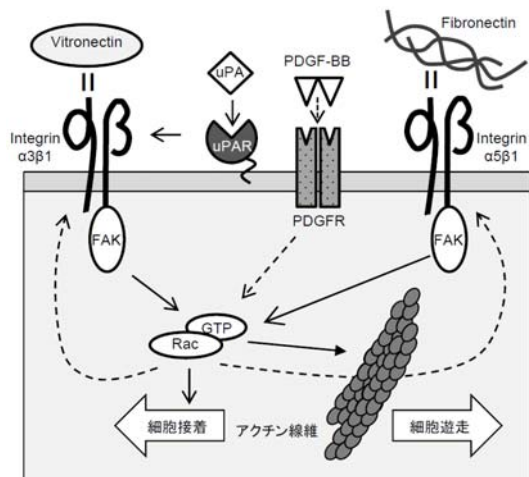
一方、integrin $\alpha 3$ と細胞膜上で結合しているウロキナーゼ受容体 (uPAR) にウロキナーゼ (uPA) の結合を阻害する integrin 阻害ペプチド ($\alpha 325$) とスクランブルペプチド (Sc $\alpha 325$)、そして integrin $\alpha 3$ 中和抗体 (Ab-ITG

$\alpha 3$) を用いて integrin $\alpha 3$ を阻害すると、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、integrin $\alpha 3$ の阻害は Ca9-22 細胞の遊走に影響しなかった。



歯根膜細胞の遊走時に発現する integrin $\alpha 3$ と integrin $\alpha 5$ は異なる細胞局在を示し、細胞遊走へ相反する影響を及ぼした。すなわち、歯根膜細胞の遊走は、integrin $\alpha 5$ と fibronectin との結合によって促進され、integrin $\alpha 3$ と vitronectin の接着によって抑制された。さらに、integrin $\alpha 3$ 阻害による細胞接着の抑制効果が、細胞遊走の促進に繋がったと考えられる。

integrin $\alpha 3$ と細胞膜上で結合している uPAR に uPA 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 uPA と vitronectin が関与している可能性が示唆された。すなわち、 $\alpha 325$ によって結合阻害された uPA が、間接的に integrin $\alpha 5$ の活性化を増強することによって、細胞遊走を促進したと考えられる。



さらに、integrin $\alpha 3$ 阻害剤は、歯肉上皮細胞に影響を与えずに、歯根膜細胞の遊走を促進することから、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。

歯周病という疾病の特性を鑑みると、保険適応が可能である高い安全性・特異性と高いコストパフォーマンスを備え持つペプチドを応用した創薬 (ペプチド療法) が望ましいと考えられる。細胞機能を制御する機能性ペプチドを持って、インテグリン-ECM 結合に

加えて、成長因子の分布や活性を調節することによって、歯周組織の恒常性と再生に有効な微小環境を確立することは、将来の歯周治療の新たな戦略になり得ると考える。

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 1 件)

① Ugawa Y, Yamamoto T, Kawamura M, Yamashiro K, Shimoe M, Tomikawa K, Hongo S, Maeda H, Takashiba S. Rho-kinase Regulates Extracellular Matrix-mediated Osteogenic Differentiation of Periodontal Ligament Cells. *Cell Biol Int*, 41(6):651-658, 2017, DOI: 10.1002/cbin.10769, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 河村麻理, 山本直史, 吉原千暁, 松永一幸, 井手口英隆, 本郷昌一, 下江正幸, 大森一弘, 高柴正悟. ROCK 阻害剤は歯根膜細胞の遊走を促進する. 第 142 回日本歯科保存学会春季大会, 2015/6/26, 北九州

② Yamamoto T. Smad2 and ROCK signaling as Potential Therapeutic Targets for Periodontal Regeneration. 63rd Japanese Association for Dental Research, Symposium, 2015/10/30, Fukuoka

③ 河村麻理, 山本直史, 山城圭介, 吉原千暁, 本郷昌一, 下江正幸, 大森一弘, 高柴正悟. 歯根膜細胞の遊走におけるインテグリンの発現制御. 第 59 回日本歯周病学会春季学術大会, 2016/5/20, 鹿児島

④ 山本直史. Osteogenic Differentiation Regulated by Rho-kinase in Periodontal Ligament Cells. 第 37 回岡山歯学会学術集会, 岡山歯学会受賞講演, 2016/10/16, 岡山

⑤ Kawamura M, Yamamoto T, Yamashiro K, Shimoe M, Yoshihara C, Ideguchi H, Aoyagi H, Omori K, Takashiba S. Role of Integrin Isoforms during Migration of Periodontal Ligament Cells. 95th International Association for Dental Research, 2017/3/24, San Francisco, United State of America

⑥ 河村麻理, 山本直史, 山城圭介, 平田千暁, 青柳浩明, 井手口英隆, 大森一弘, 高柴正悟. インテグリンサブユニットの選択的制御による歯根膜細胞の遊走促進. 第 146 回日本歯科保存学会秋季大会, 2017/6/8 【発表確定】, 青森

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 直史 (YAMAMOTO TADASHI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号 : 50432662

(2) 研究分担者

高柴 正悟 (TAKASHIBA SHOGO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 50226768

畑中 加珠 (HATANAKA KAZU)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号 : 50362992

下江 正幸 (SHIMOE MASAYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 60580264