

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19592167
 研究課題名（和文） 慢性菌周炎の及ぼす上皮—間葉細胞間相互作用の機能解明による臨床治療への応用
 研究課題名（英文） The application of functional elucidation in epithelial-mesenchymal interaction to the practical treatment in chronic periodontitis
 研究代表者
 下西 充（SHIMONISHI MITSURU）
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：40302153

研究成果の概要（和文）：我々はマラッセの上皮遺残由来上皮細胞と歯根膜由来線維芽細胞を同一シャーレ内で共培養することにより、上皮—間葉組織間に存在する基底膜の構成成分である Type IV コラーゲンを分解する MMP-2 の発現に関する検討を行った。相互作用により線維芽細胞に誘導された潜在型 MMP-2 は上皮細胞にある MMP-14 によって活性化され、Type IV コラーゲンを分解することが解明された。これらのことは、慢性菌周炎の治療へつなげていけるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The tissues were sampled from the root of human extracted teeth and produced outgrowths containing both epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligaments (HPDL). Type IV collagen were found at the interface between cells of the epithelial rests of Malassez (ERM cells) and HPDL fibroblasts. MMP-2 can degrade type IV collagen. The current study was undertaken to examine the expression of MMP-2 at the interface. These findings indicate that the ERM cells stimulate the production of MMP-2 in HPDL fibroblasts. Up-regulated MMP-2 activated by MMP-14 in ERM cells could degrade matrix molecules, such as Type IV collagen in the basal membrane between ERM cells and HPDL fibroblasts. We believe that these results are applied to the practical treatment in chronic periodontitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫・感染・炎症、マラッセの上皮遺残

1. 研究開始当初の背景

歯牙は常に感染の危険にさらされ異物化しやすい。細菌は歯周ポケットを介して、容易に歯周組織さらには顎骨内へ侵入する。このような細菌の侵入を防ぐ一つの機構として、歯肉上皮が根尖方向に増殖し、上皮というバリアーを延長し補強することが挙げられる。一方、この歯肉上皮の増殖という生体防御反応は、歯周ポケットの増大を招くことで歯根膜が失われ、結果として歯牙を排除してしまう。歯肉上皮が増殖し侵入していく歯根膜には、もうひとつの上皮細胞の集団であるマラッセの上皮遺残が存在する。マラッセの上皮遺残は、単に無用になった歯原性上皮細胞が偶然歯根膜中に残存した結果生じたものではなく、上皮細胞が何らかの目的を持って結合組織中で生き残るために、さまざまな細胞活性を発現し、自らの力で上皮細胞集団を形成し維持していると考えられる。マラッセの上皮遺残は、歯根膜内で歯頸部から根尖付近までネットワークを形成して分布しているため、この分布様式が歯周炎における歯肉上皮の下方増殖を阻止し、細菌の進入を防いでいる可能性が示唆されているが、その作用機序はいまだ不明である。

これまで、われわれはヒト歯根膜組織片から上皮細胞および同由来線維芽細胞を同一シャーレ内で培養し、その細胞間相互作用に関する研究を行ってきた。この培養系は、はじめ線維芽細胞を培養した後、培地を独自に開発した無血清混合培地に交換することによって上皮細胞を誘導し、細胞間の境界が明瞭な状態で混培養ができる。

この境界部は、上皮-間葉組織間に存在する基底膜の構成成分である細胞外マトリックスのType IVコラーゲンおよびラミニンの発現が認められ(Shimonishi et al., Eur J Oral

Sci 2005; 113: 34-40)、細胞間相互作用が行われていることが確認されている。この基底膜は上皮-間葉組織間のバリアーであり、組織間の恒常性を維持する上で大切なものである。さらに、この境界部でSIBLING (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins) familyであるBone Sialoprotein (BSP)とOsteopontin (OPN)の発現が強くみられた。BSPは特異的に潜在型マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -2を活性型MMP-2に、OPNは特異的に潜在型MMP-3を活性型MMP-3にすることが知られている (Fedarko et al., FASEB J 18:734-736)。

MMP-2およびMMP-3はTypeIVコラーゲンおよびラミニンの分解活性を持つことから、この培養系においても上皮細胞-線維芽細胞間の境界部における特異的な発現が考えられる。さらに、活性化されたMMPはいつまでも基質を分解し続けるわけではなく、内因性特異的なインヒビターであるTIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase)により阻害される。

2. 研究の目的

SIBLING familyであるBSPおよびOPNと、それらに特異的に活性化されるMMP-2、-3およびTIMPの発現との関わりを明らかにし、上皮細胞-線維芽細胞間相互作用による恒常性維持のメカニズムの解明を行うことである。

3. 研究の方法

研究計画・方法 (平成 19 年度)

歯学部附属病院口腔外科外来で拔牙した第三大臼歯より歯根膜組織を採取し、無血清混合培地により同一組織片より上皮細胞および線維芽細胞を培養し、境界部の確認をした後、サンプルとして実験に供する。なお、患者からは事前に抜去歯が実験に供される

ことの同意を得るとともに、歯学研究科倫理委員会にて本研究の承認を受けるものとする。

Firthらは培養したブタのマラッセの上皮遺残からMMP-2およびMMP-3の遺伝子発現を確認している(*Infect Immun* 1997; 65: 4931-4936)。そのなかでMMP-2は病原毒性因子の影響を受けないことが報告されている。すなわち、MMP-2遺伝子発現に関して細菌感染による影響は上皮組織よりも間葉組織による影響が大きいことが考えられる。

がん組織でMMP-2遺伝子が周囲の線維芽細胞で強く発現していること、また、これまでの研究が単独培養に基づくデータで、相互作用に関するデータが乏しいことから、上皮細胞および線維芽細胞間の境界部におけるMMP-2の遺伝子発現を確認することは重要であると思われる。MMP-2は上皮組織および間葉組織間に豊富に含まれるType IVコラーゲン分解活性を持つ。本培養系において、基底膜の構成成分である細胞外マトリックスのType IVコラーゲンおよびラミニンの発現が認められ(Shimonishi et al., *Eur J Oral Sci* 2005; 113: 34-40)、MMP-2との関係においては密接なものがあると思われる。

また、MMP-2に関しては遺伝子発現とタンパク発現に食い違いが生じること、さらに、MMP-2との比較検討からMMP-3の遺伝子発現とタンパク発現も以下の方法で検討を行う。

1、*In situ* hybridization法

2、免疫染色法

研究計画・方法（平成20年度以降）

平成20年度以降においても、平成19年度の研究計画を随時遂行していく。

さらに、すでに確認されているSIBLING familyであるBSPおよびOPNの発現とMMPおよびTIMPの発現細胞を比較検討し、相互作用によるメカニズムを明らかにするため、以下の

項目に関して検討を行っていく。

(1) SIBLING familyであるBSPおよびOPNとMMP-2、MMP-3の関係を明らかにする。

すでに述べてきたが、MMP-2はBSPと、MMP-3はOPNと密接に関わりあっている。BSPとOPNでその発現は異なるため、MMP-2とMMP-3の発現状況も異なると思われる。それぞれの発現状況を二重染色法を用いて遺伝子レベル、タンパクレベルで解析を行う。

(2) MMP-2、MMP-3のmRNAの定量化

境界部の細胞のみをシャーレから部分的に採取し、RNAを抽出する。MMP-2およびMMP-3の遺伝子をRT-PCR法により定量化し、その発現がBSPおよびOPN遺伝子発現量と大きく関係するのか検討する。

(3) TIMPとMMP-2、MMP-3の関係を明らかにする。

活性化されたMMPはいつまでも基質を分解し続けるわけではなく、内因性特異的インヒビターであるTIMPにより阻害される。同様にTIMPに関してもタンパク質発現、遺伝子発現を検討する。

4. 研究成果

免疫染色では、MMP-2は上皮細胞に強く発現したが、*In situ* hybridization法では、MMP-2のmRNAはむしろ線維芽細胞側でその発現がみられた。一方、MMP-14のmRNAは上皮細胞でその発現が強くみられた。RT-PCR法では、MMP-2のmRNAの発現は共培養した方が単独培養に比べ強かった。ウェスタンブロット法では共培養した培地中に活性化されたMMP-2の発現がみられた。MMP-3はいずれの方法においても発現が観察されなかった。

以上より相互作用により誘導された潜在型MMP-2はMMP-14によって活性化され、Type IVコラーゲンを分解することが示唆された。これらのことから、細胞間相互作用により、基底膜の構成成分が上皮細胞—線維芽細胞間境界部で

発現し、基底膜のリモデリングに關与する酵素 MMP-2 および MMP-14 も同定され、齒根膜の恒常性維持にマラッセの上皮遺残が關与する可能性があることを明らかにした。

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 3 件)

1. Mitsuru Shimonishi et al. Induction of MMP-2 at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. Journal of Periodontal Research、査読有、45 卷、2010 年、309-316
2. Mitsuru Shimonishi et al. Mutual induction of noncollagenous bone proteins at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. Journal of Periodontal Research、査読有、43 卷、2008 年、64-75
3. Mitsuru Shimonishi et al. *In vitro* differentiation of epithelial cells cultured from human periodontal ligament. Journal of Periodontal Research、査読有、42 卷、2007 年、456-465

[学会発表] (計 5 件)

1. 下西 充 他、培養ヒト齒根膜由来上皮細胞および線維芽細胞間における MMP-2 の誘導、日本齒周病学会、2009 年 10 月 11 日、宮崎
2. Mitsuru Shimonishi et al. Activation of matrix metaroproteinase (MMP)-2 at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. 第 3 回インターフェイス口腔健康科学国際シンポジウム、2009 年 1 月 16 日、仙台
3. 下西 充 他、培養ヒト齒根膜由来上皮細胞および線維芽細胞間における Bone sialoprotein および Matrix metaroproteinase -2 の発現、日本齒科保存学会、2008 年 11 月 6 日、富山
4. Mitsuru Shimonishi et al. MMP-2 AND MMP-14 EXPRESSIONS BY EPITHELIAL-MESENCHYMAL INTERACTIONS IN VITRO. 86th General Session & Exhibition of the IADR、2008 年 7 月 3 日、トロント(カナダ)
5. 下西 充 他、培養ヒト齒根膜由来上皮細胞および線維芽細胞間における Matrix metaroproteinase-2 および-14 の発現、日

本齒科保存学会、2007 年 11 月 8 日、岡山

[図書] (計 1 件)

1. Mitsuru Shimonishi et al. Springer社、Interface Oral Health Science 2009、2010 年、123-125

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下西 充 (SHIMONISHI MITSURU)
東北大学・病院・助教

研究者番号：40302153

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：