

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09978

研究課題名(和文) 歯肉接合上皮の維持・防御機構における低分子量Gタンパク質Cdc42の機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of Cdc42 in the maintenance and defense mechanisms of gingival junction epithelium.

研究代表者

相澤 怜 (Aizawa, Ryo)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：80710673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、不死化接合上皮細胞JE-1を用いて、接合上皮の歯周炎制御におけるCdc42の機能について検討を行った。Porphyromonas gingivalis由来LPSでJE-1を刺激したところ、細胞増殖・遊走能が低下することが示唆された。遺伝子発現の検討から、LPSによってJE-1におけるCdc42、Cxcl2やSlpiの発現の増加、Cxcl10、Cdh1およびItgb4の発現の減少が認められた。これらの結果から、Cdc42が細胞骨格や細胞運動を制御し、細胞間透過性を亢進させることで、Cdc42が接合上皮細胞の歯周病原細菌に対する防御機能の亢進にも関与す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

Cdc42と歯周病に着目した研究はこれまでほとんどなく、特に接合上皮細胞におけるCdc42の役割は明らかでなかった。本研究結果から、接合上皮の歯周炎に対する防御機能において、Cdc42が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、Cdc42に着目した歯周炎の予防および治療に有用な手法を見出せる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the function of Cdc42 in the protective state of junctional epithelium against periodontitis using immortalized junctional epithelial cells JE-1. Stimulation of JE-1 with LPS derived from Porphyromonas gingivalis was shown to decrease cell proliferation and migration capacity. Examination of gene expression showed that LPS increased the expression of Cdc42, Cxcl2 and Slpi, and decreased the expression of Cxcl10, Cdh1 and Itgb4 in JE-1. These results suggest that Cdc42 may also be involved in enhancing the defense of junctional epithelial cells against periodontal pathogenic bacteria by regulating cytoskeleton and cell motility and increasing intercellular permeability.

研究分野：歯周病学

キーワード：Cdc42 不死化接合上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔内の歯肉上皮は、口腔上皮、歯肉溝上皮、接合上皮から成り立つ。接合上皮は細胞間隙の広い非角化性組織であり、抗菌ペプチド、好中球やマクロファージが細胞間を通過することが知られている。すなわち、接合上皮は口腔細菌の侵入に対して最前線に位置し、防御の役割を果たしている。しかし、接合上皮は良好なマーカーが確立されておらず、単離、細胞株の作製が困難であったことから、特に *in vitro* における有用な接合上皮の研究材料が存在せず、詳細な解析が困難であった。近年、我々はマウスにおける人工再構成歯胚技術を用いて、GFP 陽性接合上皮細胞の単離、不死化細胞 (JE-1) の作製に成功した ()。

Rho ファミリーGTP 結合タンパク質 (低分子量 G タンパク質) に属する Cdc42 は生体においてユビキタスに発現していると考えられている。Cdc42 はアクチン細胞骨格系の制御を介した細胞運動を通して個体発生、発癌、神経細胞のネットワークなど、細胞の様々な高次機能を制御していることが *in vitro* での研究から明らかになっている ()。しかし、Cdc42 を全身で欠損させたノックアウトマウスは胎生初期に死亡するため、個体レベルにおける機能については不明な点が多く、接合上皮における Cdc42 の機能については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、不死化接合上皮細胞を用いて、接合上皮の歯周炎制御における Cdc42 の機能を解明することである。

3. 研究の方法

JE-1 を歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS で 1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ にて 48 時間刺激し、細胞生存率に影響がない LPS 濃度を検討した。同様に LPS で刺激した JE-1 に対し、scratch assay を行い、細胞の増殖、遊走能の比較検討を行った。LPS 存在・非存在下にて培養した JE-1 の Cdc42、細胞接着および免疫に関与する遺伝子の発現について real-time PCR 法を用いて解析した。さらに、FITC-dextran を用いて、細胞間透過性の評価を行った。

4. 研究成果

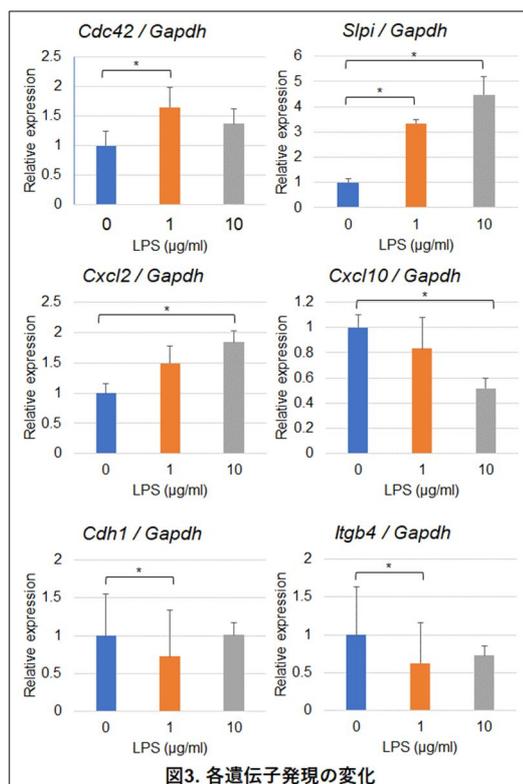
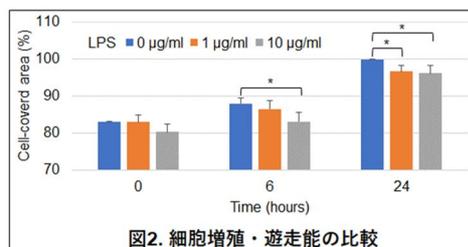
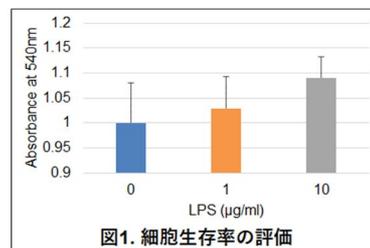
LPS 存在・非存在下にて培養した JE-1 に対し、MTT Assay を行い、細胞生存率の検討を行ったところ、細胞生存率に有意差は認められなかった (図 1)。このことから、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ LPS で刺激した JE-1 を用いて、各種検討を行うこととした。

JE-1 培養系に scratch assay を行ったところ、細胞の分布面積の割合は対照群において、24 時間ではほぼ 100%であったが、LPS 刺激群においては有意に低かった (図 2)。この結果から、接合上皮細胞は炎症状態において、細胞増殖・遊走能が低下することが示唆された。

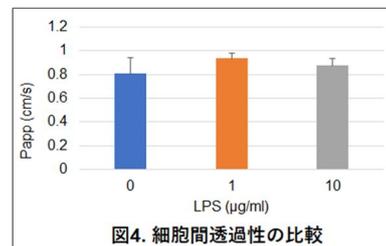
Cdc42、細胞接着および免疫に関与する遺伝子の発現について real-time PCR 法を用いて検討したところ、LPS 存在下で培養した JE-1 において、炎症性因子である Cxcl2、抗炎症作用を有する Secretory leukocyte protease inhibitor (Slpi) の発現の増加、および免疫細胞の誘導に関与する Cxcl10 の発現の減少が認められた。また、1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS で刺激した JE-1 において、Cdc42 の発現の増加、および細胞間接着に関与する Cdh1、Itgb4 の発現の減少が認められた (図 3)。

さらに、細胞間透過性の評価を行ったところ、有意差は認められなかったものの、1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS で刺激した JE-1 において、細胞間透過性の亢進傾向が認められた (図 4)。

以上の結果から、Cdc42 は低濃度の *P. gingivalis* 由来 LPS に対して、接合上皮細胞の細胞骨格や運動を制御することで、歯周炎の防御および進行に関与することが示唆された。接合上皮の上皮バリ



ア機能には細胞間接着が重要な役割を果たしており、細胞間透過性が亢進することで、歯周病原細菌に対するバリア機能が低下すると考えられる。一方で、細胞間透過性の亢進により、補体や抗菌ペプチドである defensin などの歯肉溝滲出液への誘導が増加することも考えられ、Cdc42 が接合上皮細胞の歯周病原細菌に対する防御機能の亢進にも関与する可能性が考えられる。



<参考文献>

Etienne-Manneville S and Hall A: Rho GTPases in cell biology. Nature. 420(6916): 629-635, 2002.

Seki T, Aizawa R, Tanaka J, Yajima-Himuro S, Kato M, Tanaka K, Mishima K, Yamamoto M: Establishment of mouse gingival junctional epithelial cell line using a bioengineered tooth system. Biochem Biophys Res Commun. 497(1): 167-172, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishikawa Taichi, Sasaki Daisuke, Aizawa Ryo, Yamamoto Matsuo, Yaegashi Takashi, Iri? Tarou, Sasaki Minoru	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of Lactic Acid on Wound Healing, Cell Growth, Cell Cycle Kinetics, and Gene Expression of Cultured Junctional Epithelium Cells in the Pathophysiology of Periodontal Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1507 ~ 1507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10111507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Keisuke, Tanaka Junichi, Aizawa Ryo, Kato-Tanaka Mayu, Ueno Hiroo, Mishima Kenji, Yamamoto Matsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure of junctional epithelium is maintained by cell populations supplied from multiple stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98398-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Taichi, Sasaki Daisuke, Aizawa Ryo, Shimoyama Yu, Yamamoto Matsuo, Iri? Tarou, Sasaki Minoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of Butyric Acid in the Proliferation and Migration of Junctional Epithelium in the Progression of Periodontitis: An In Vitro Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 44 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/dj9040044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Matsuo, Aizawa Ryo	4. 巻
2. 論文標題 Maintaining a protective state for human periodontal tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Periodontology 2000	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/prd.12367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa Ryo, Tanaka Junichi, Mishima Kenji, Yamamoto Matsuo	4. 巻 64
2. 論文標題 Mechanisms of junctional epithelial homeostasis revealed by the accumulation of knowledge	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (Journal of the Japanese Society of Periodontology)	6. 最初と最後の頁 121 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2329/perio.64.121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田中慧介, 田中準一, 相澤 怜, 田中麻友, 上野博夫, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 接合上皮細胞は推定上の幹細胞により供給される
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中慧介, 田中準一, 相澤 怜, 田中麻友, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 多色細胞系譜追跡法を用いた歯肉接合上皮幹細胞様細胞の探索
3. 学会等名 第67回昭和大学学士会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tanaka K, Tanaka J, Aizawa R, Kato-Tanaka M, Ueno H, Mishima K, Yamamoto M
2. 発表標題 Investigation of junctional epithelial stem/progenitor cells using the multicolor lineage tracing method
3. 学会等名 第106回アメリカ歯周病学会共催日本歯周病学会・日本臨床歯周病学会2020年大会(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中慧介, 田中準一, 相澤 怜, 吉田真子, 松浦 徹, 藤田恭平, 田中麻友, 上野博夫, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 多色細胞系譜追跡法を用いた歯肉接合上皮細胞のクローナリティ解析
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相澤 怜, 田中慧介, 田中準一, 菅野真莉加, 美島健二, 山本松男
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis由来LPSが不死化接合上皮細胞の細胞機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大歯学部歯科保存学講座歯周病学部門 http://www10.showa-u.ac.jp/~perio/index.html 昭和大歯学部研究者情報・業績集 https://rira.showa-u.ac.jp/search/index.html?lang=ja&template=template1
--

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
研究分担者	田中 準一 (Tanaka Junichi) (40710166)	昭和大歯学部・歯学部・講師 (32622)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	美島 健二 (Mishima Kenji) (50275343)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	

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