

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16935

研究課題名（和文）上皮細胞-樹状細胞の連携による上皮細胞間バリア構築と歯周病への応用

研究課題名（英文）Construction of epithelial cell barriers through epithelial cell-dendritic cell crosstalk and its application to periodontal disease.

研究代表者

池崎 晶二郎（Ikezaki, Shojiro）

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：00849276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病は歯周病原菌による歯周組織の炎症性疾患であり、歯肉の付着上皮がその防御機構に関与している。本研究は、付着上皮の細胞間接着装置維持のメカニズムに焦点を当て、セマフォリン（Sema）が与える影響を調査した。まず、マウス付着上皮細胞株mHAT-JE01を樹立し、マウス樹状細胞との共培養でオクルジンとSema4Aの遺伝子発現が上昇することを確認した。さらに、接合上皮シートを作成し経上皮電気抵抗（TEER）を測定、Rhoキナーゼ阻害実験でTEER値が低下することを発見した。この結果から、接合上皮がSema4Aをオートクライン作用させ、上皮バリアを維持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

付着上皮は歯肉において、外部環境からの異物侵入の障壁となる重要な構造である。この研究課題内で樹立した付着上皮細胞株は、細胞培養による歯周炎・付着上皮研究が発展するのに役立つと考えられる。また、実験結果から、免疫細胞である樹状細胞の新たな役割として付着上皮のバリア向上への関与が考えられた。現在の歯周病予防は、細菌要因・環境要因に重点を置いたものであるが、上皮細胞・免疫細胞にフォーカスした新たなアプローチの開発につながる研究である。

研究成果の概要（英文）：Periodontal disease is an inflammatory disease of periodontal tissues caused by periodontal pathogens, and junctional epithelium is involved in the defense mechanism. In this study, we focused on the mechanism of maintenance of the intercellular adhesion apparatus of junctional epithelium and investigated the effect of semaphorin (Sema). First, we established a mouse junctional epithelial cell line, mHAT-JE01, and confirmed that gene expression of occludin and Sema4A increased when co-cultured with mouse dendritic cells. Furthermore, we created junctional epithelial sheets and measured transepithelial electrical resistance (TEER), and found that the TEER value decreased in Rho kinase inhibition experiments. These results suggest that the junctional epithelium may autocrine-activate Sema4A to maintain 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 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は口腔内に常在する歯周病原菌によって引き起こされる炎症性病変である。歯を支持する歯周組織(歯肉, 歯根膜, 歯槽骨)に対する病的変化がおき、不可逆的な歯周組織の破壊によって歯を喪失する原因となる。歯肉上皮のうち、エナメル質に面した付着上皮は病態進行に対するバリアとして重要な役割をもつ部位である。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速く、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。

セマフォリン(Sema) は神経軸索ガイダンス因子として知られる分子であり、神経系以外に消化器系、免疫系の細胞にも発現しアトピー性皮膚炎や多発性硬化症などの疾患と関連することが知られている(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、付着上皮の由来となるエナメル上皮における細胞間接着と分化を制御する因子として Sema4D-PlexinB1-LARG のシグナルが働いていることを報告した(J Bone Miner Res. Nov;31(11):1943-1954 2016)。さらに、申請者は以前の研究課題(研究活動スタート支援, 課題番号: 19K24128)において、付着上皮がセマフォリン 4 のサブタイプである Sema4A とその受容体である PlexinB2 を発現していることを見出した。一方で、Sema4A は抗原提示細胞である樹状細胞でも発現し、T 細胞の分化を誘導する因子の一つとして働いていることがわかっている(Sato et al. J Exp Med. 2006 Nov 27;203(12):2673-82.)。しかしながら、細胞間接着やターンオーバーについてユニークな特徴を持つ付着上皮において、上皮細胞と樹状細胞に共通して発現している Semaphorin の役割には明らかではない部分がある。

これまでの報告から、上皮細胞と樹状細胞に発現する Sema4A はオートクライン的に作用して付着上皮におけるバリア構築を制御しているのではないかとの問いを立てた。そしてそのメカニズムを調べることによって、「未だ知られていない樹状細胞の新たな機能」と「歯周病の病態における付着上皮の組織構造の意味」が明らかになると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は「付着上皮の細胞間接着装置などの構造における上皮-樹状細胞間コミュニケーションの役割を明らかにする」ことである。本課題は Sema4A にフォーカスを当て、その下流の Rho シグナルの発現変化を介した歯周組織細胞の連携によるバリア機能のメカニズムを明らかにして、歯周病発症の病態解析、診断、予防ならびに治療法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

#### 1) マウス付着上皮細胞株の樹立

マウス切歯幹細胞が存在する Apical bud の細胞から、ハイドロキシアパタイトへの接着能をもち付着上皮特有に発現する遺伝子を発現する細胞をセレクション・クローニングしてマウス付着上皮細胞株 mHAT-JE01 を樹立した。この細胞の発現遺伝子を免疫組織学的、RT-qPCR により確認した。アパタイトへの接着・増殖能を口腔粘膜上皮細胞と比較した。

## 2) mHAT-JE01-樹状細胞共培養条件における遺伝子発現の評価

マウス骨髄細胞より分化誘導した樹状細胞 (BMDC) との共培養条件下における、mHAT-JE01 のタイトジャンクション(TJ)や Sema4A の遺伝子発現を RT-qPCR で確認した。

## 3) 上皮細胞における細胞間接着装置バリア機能の評価

トランズウェル上でシート状に培養した mHAT-JE01(図 1)における基底面と管腔面の経上皮電気抵抗(TEER)を測定する。上皮シート培養において Sema4A の下流で活性化する ROCK シグナルを阻害する Y27632 を添加して TEER の変化を観察した。

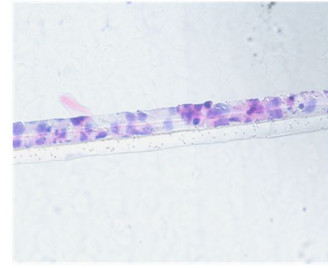


図1：mHAT-JE01 シートの染色像

## 4 . 研究成果

### 1 ) マウス付着上皮細胞株の樹立

樹立したマウス付着上皮細胞株 mHAT-JE01 は ODAM, FDC-SP, Nephronectin などの付着上皮マーカーのタンパク・遺伝子発現を認めた。さらに、口腔粘膜上皮と比較してハイドロキシアパタイトへの接着能・増殖能が高いことがわかった。mHAT-JE01 培養条件に歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来のリポ多糖を添加したところ、タイトジャンクションを構成する Claudin-1, Occludin と ODAM, FDC-SP の発現低下を認めた。これらの結果から、*P. gingivalis* 感染により、付着上皮のバリア機能低下は低下していることが考えられた。この研究課題内で樹立した mHAT-JE01 は付着上皮の異常を in vitro で検証するのに有用であると言える。細胞樹立についての研究結果を論文にまとめて報告した (J Oral Science. Mar;65(1):47-54 2023)。

## 2) mHAT-JE01-樹状細胞共培養条件における遺伝子発現の評価

*P. gingivalis* LPS 添加培養条件における mHAT-JE01 は BMDC との共培養により、Occludin の発現量が回復し、Sema4A の発現量が上昇していた(図 2)。この結果から、mHAT-JE01 は樹状細胞からの誘導で Sema4A を自己分泌するとともに、タイトジャンクションを回復していると示唆された。

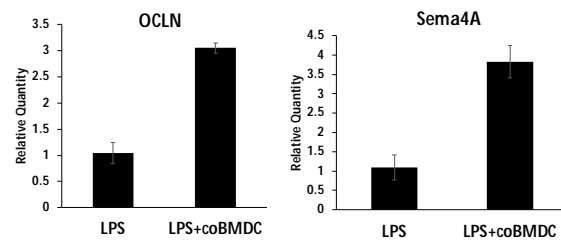


図2：mHAT-JE01 炎症誘導条件培養とマウス樹状細胞 (BMDC) の共培養により OCLN, Sema4Aの遺伝子発現が上昇した。

## 3) 上皮細胞における細胞間接着装置バリア機能の評価

mHAT-JE01 上皮シート培養に対して Sema4a の下流の Rho/ROCK シグナルを阻害する ROCK インヒビター Y27632 を加えたところ、上皮バリアの低下を認めた(図 3)。

結果より、接合上皮のバリア機能維持には Rho/ROCK シグナルが関与していると考えられた。本研究課題で樹立した細胞・細胞シートを用いた実験系で、Sema-Rho シグナルを活性化し、上皮バリアを向上させる因子を探索することで新たな歯周病予防・治療の開発に寄与することを期待している。

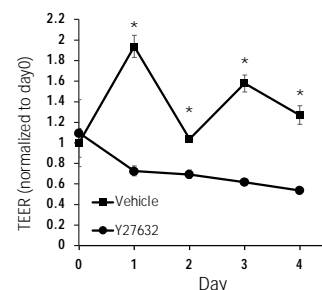


図3：mHAT-JE01上皮シートの ROCKシグナル阻害により、上皮バリア機能が低下した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikezaki Shojiro, Otsu Keishi, Kumakami-Sakano Mika, Harada Hidemitsu	4. 巻 65
2. 論文標題 A novel junctional epithelial cell line, mHAT-JE01, derived from incisor epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 47～54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2023.01.004	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池崎晶二郎、熊上(坂野)深香、大津圭史、原田英光
2. 発表標題 マウス付着上皮細胞培養系と細胞株の樹立
3. 学会等名 第128回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shojiro Ikezaki, Keishi Otsu, Mika Kumakami-Sakano, Hidemitsu Harada
2. 発表標題 A novel junctional epithelial cell line, mHAT-JE01, derived from incisor epithelial cells
3. 学会等名 International Seminar on Tooth Development and Regeneration（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池崎晶二郎、高満正宜、新藤美湖、大津圭史、原田英光
2. 発表標題 Establishment of mouse junctional epithelial cells and culture system
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023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
---------	---------