

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 24日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890119

研究課題名（和文） 歯肉上皮細胞における増殖因子による細胞接着因子制御のメカニズムの分子生物学的解明

研究課題名（英文） The molecular biological analysis of the mechanism for cell adhesion mediated by growth factor in human gingival epithelial cells

研究代表者

山城 圭介 (YAMASHIRO KEISUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30581087

研究成果の概要（和文）：

歯周病は歯周病原細菌の感染が原因で起こる慢性炎症で、日本人の約8割が罹患していると言われており、歯の喪失のもっとも大きな原因である。しかし個人差による進行の程度などわからないことも多い。歯肉上皮と歯が接着することは細菌感染に対する物理的バリアとなっており、接着を強固にすることは歯周病の予防に大変重要であると考えられる。本研究では、歯肉上皮細胞が産生する増殖因子が、細胞接着を制御していると仮説を立てそのメカニズムを調べたものである。

研究成果の概要（英文）：

Periodontal disease, chronic inflammation disease, is caused by infection of periodontal pathogen. It is thought that about 80% of Japanese are affected and it is a major cause of tooth loss. It is still unknown that the difference of progression of periodontal disease for each patient. It is thought that the attachment between gingival epithelial cells and tooth is a physical barrier from infection, and this attachment is important for prevention of periodontal disease. In this study, we hypothesis that growth factors secretes from gingival epithelial cells regulate the attachment between gingival epithelial cells and tooth, and we investigate the mechanism about the regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯肉上皮細胞，TGF- $\beta$ ，インテグリン，細胞外基質，Smad2，*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 歯周病における歯肉上皮の役割

歯周病は歯周病細菌の感染によって引き起こされる炎症性疾患であるが，その際歯肉上皮細胞は歯と直接結合して細菌が歯周組織に侵入することを防いでいる。しかし細菌の刺激により単球やリンパ球等が炎症性サイトカインを過剰に産生すると，上皮細胞同士の結合，そして上皮細胞と歯の結合が壊され，細菌がポケット深部まで侵入する。そして炎症が歯周組織深部まで及ぶことにより，歯周組織の破壊が著しいものとなる。

このことから，歯肉上皮が細胞間もしくは組織間において正常な結合状態を維持する事は，歯周病の進行を抑制する上で大変重要と考えられる。

### (2) 上皮におけるTGF- $\beta$ による接着因子制御

上皮細胞において，TGF- $\beta$ を介するシグナル伝達経路が細胞増殖（Tucker et al, Science 1984）や創傷治癒（Roberts et al, Proc Natl Acad Sci USA 1986）に大きく関わっていることが理解されているが，近年の研究によるとこれらの機能以外にもTGF- $\beta$ が上皮細胞の細胞接着を制御していることが報告されている。

E-cadherinは上皮細胞におけるアドヘレンスジャンクションを構成する代表分子であり，TGF- $\beta$ は発生期や癌の上皮細胞においてE-cadherinの発現を抑制させる事が多く報告されている（Nawshad et al, J Cell Sc 2007, Shirakihara et al, Mol Biol Cell 2007）。

申請者は以前に在籍したブリティッシュコロンビア大学歯学部にて，口蓋が癒合する際の上皮細胞においてTGF- $\beta$ 3を介するシグナル伝達経路，特にp38 MAPKとPI3K/Aktといった伝達経路がSnailという転写因子を介して

E-cadherinの発現量を減少させることを報告した（Yamashiro et al, IADR, Miami, FL, USA 2009）。これらのことから上皮細胞における細胞接着因子の制御に対してTGF- $\beta$ が大変重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

歯周病において歯肉上皮は細菌が歯周組織に侵入する際の最初のバリアとして重要な役割を担っており，上皮の細胞間，もしくは上皮と歯の結合が破壊されることは歯周病のさらなる進行につながると考えられる。本研究の目的は，歯肉上皮細胞においてTGF- $\beta$ が細胞間接着因子の発現を制御すると仮説をたて，そのメカニズムを解明する事である。これら基礎的研究から得られたデータより，将来の歯周病進行抑制の研究への臨床応用が期待出来ると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1). 培養ヒト歯肉上皮細胞を歯周病原細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa Y4) で刺激した際，TGF- $\beta$  群の発現が誘導されるか検討する。またその際，細胞接着因子および細胞外基質にどのような変化を及ぼすのか検討する。

① 培養ヒト歯肉上皮細胞を Aa Y4 で刺激し，細胞上清，全 RNA，タンパク質をそれぞれ回収し，TGF- $\beta$ 1 および TGF- $\beta$ 3 の発現量をウェスタンブロット法，リアルタイム PCR 法で測定する。

② 培養ヒト歯肉上皮細胞を Aa Y4 で刺激し，接着能が変化するか接着アッセイ法を用いて検証する。

③ 培養ヒト歯肉上皮細胞を Aa Y4 で刺激し，

全 RNA を回収し、各種インテグリン、細胞外基質の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で測定する。

(2). 培養ヒト歯肉上皮細胞において TGF- $\beta$  の下流の因子である Smad2 および Smad3 が細胞接着因子および細胞外基質にどのような変化を及ぼすのか検討する。

具体的な手法は Aa Y4 刺激時と同様に行う。

#### 4. 研究成果

培養ヒト歯肉上皮細胞を Aa Y4 で刺激した際、TGF- $\beta$ 1 の発現は遺伝子レベル、タンパクレベル共に変化しなかった。しかし TGF- $\beta$ 3 に関しては、上清中のタンパクレベルで上昇を認めた。

培養ヒト歯肉上皮細胞を Aa Y4 で刺激した際、細胞接着能は有意に低下した。また、細胞外接着因子であるインテグリン  $\alpha$ 2、インテグリン  $\alpha$ 3、インテグリン  $\beta$ 4、インテグリン  $\beta$ 6 の遺伝子発現量は有意に低下した。しかし、インテグリン  $\alpha$ 5 のみ発現量が有意に増加した。また細胞外基質であるテネイシン C、フィブロネクチンの遺伝子発現量は有意に低下したが、ベルシカン は発現量が増加した。

また Smad2 を過剰発現させた細胞においては、細胞接着能は上昇した。Smad3 を過剰発現させた細胞においては、細胞接着能に変化は認められなかった。

Smad2 を過剰発現させた細胞において、インテグリン  $\alpha$ 2、インテグリン  $\alpha$ 3、インテグリン  $\alpha$ 5、インテグリン  $\beta$ 4、インテグリン  $\beta$ 6 の遺伝子発現量は有意に上昇した。Smad3 を過剰発現させた細胞において、Smad2 過剰発現時ほどの変化は認められず、インテグリン  $\alpha$ 5 に関してはその遺伝子発現量が減少した。テネイシン C、フィブロネクチン 1 の遺伝子発現量は有意に上昇した。

以上の結果から、Aa Y4 刺激により歯肉上

皮細胞上における細胞接着因子、細胞外基質の遺伝子発現量は減少し、反対に Smad2 過剰発現によりこれらは上昇した。しかし、インテグリン  $\alpha$ 5、ベルシカンなどはどちらの刺激においても遺伝子発現量は上昇した。これは大変興味深い事実と思われる。歯肉上皮細胞に細菌が感染した際、細胞は感染から身を守るために防御機構を働かせる必要がある。この際インテグリン  $\alpha$ 5、ベルシカンなどをレセプターとして用いることで、細胞内にシグナルを伝えると考えられる。このことにより上皮は抗菌ペプチド、IL-8 などの好中球遊走因子を放出し、細菌と対峙すると考えられる。しかし菌量が多い場合や、病原性が高い細菌種が感染した場合は、これらの防御機構が働かず、細菌の侵入を認めてしまうものと考えられる。インテグリン  $\alpha$ 5、ベルシカンなどの発現をコントロールすることにより、感染の拡大を防ぐことができるのか、今後も検討が必要である。また、TGF- $\beta$  シグナリングの重要な因子である Smad2 は、細胞接着能に強く関与していることが解明された。歯周病の進行の予防、再生療法への応用することができるかどうか、今後の課題である。

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 高知信介, 山城圭介, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* がヒト歯肉上皮細胞の細胞接着因子に及ぼす影響, 平成 23 年度秋季日本歯科保存学会, 平成 23 年 10 月 21 日, 大阪府大阪市
- ② 本郷昌一, 山城圭介, 歯肉上皮細胞において外因性 Smad2 は細胞接着分子の発現

を促進する，第 54 回秋季日本歯周病学会，平成 23 年 9 月 23 日，山口県下関市

[その他]

ホームページ等

[http://www.cc.okayama-u.ac.jp/~perio/bi  
nd2/index.html](http://www.cc.okayama-u.ac.jp/~perio/bi<br/>nd2/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山城 圭介 (YAMASHIRO KEISUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30581087

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

山本 直史 (YAMAMOTO TADASHI)

岡山大学病院 講師

研究者番号：50432662

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