

Smad2 による歯肉上皮細胞と細胞外基質の
接着促進に関する研究

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻
病態機構学講座 歯周病態学分野

本郷昌一

Smad2 Enhances Adhesion of Gingival Epithelial Cells to Extracellular Matrix

Department of Pathophysiology-Periodontal Science,
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Shoichi HONGO

(平成 24 年 12 月 11 日受付)

緒言

歯周組織は、軟組織である歯肉および歯根膜、そして硬組織であるセメント質および歯槽骨によって構成されている¹⁾。さらに、歯肉上皮は、口腔に面する口腔上皮、歯に面するが接触していない歯肉溝上皮、および歯面に付着している接合上皮に解剖学的に分類される²⁾。歯周炎は、細菌感染によって歯肉に初発した炎症が、歯槽骨を含む深部歯周組織に波及して生じる炎症性破壊性疾患である³⁾。歯と接合上皮は、歯面にある内側基板と接合上皮との間でヘミデスモゾーム結合を形成することによって接着しており、この接着には細胞接着分子である *integrin* と細胞外基質 (Extracellular matrix ; ECM) が関与している⁴⁾。接合上皮の *integrin* と ECM は、細菌の内毒素であるリポ多糖 (lipopolysaccharide ; LPS)、や細菌産生物であるロイコトキシン、コラゲナーゼ、およびジンジパインなどの病原因子によって分解される。さらに上皮細胞の形態変化、運動性の低下、および細胞死が起こることによって、接合上皮の付着は破壊される⁵⁾。この結果、歯周ポケットが形成され、歯周病原細菌はより増殖しやすい嫌気的な環境を獲得する。そして、歯肉深部へ病原因子を浸潤し、免疫応答を誘導させ、炎症を増悪させる。すなわち、接合上皮は歯周炎の原因となる細

菌感染に対するバリアーとなっている⁶⁾。歯周炎の進行を抑え、重症化を防ぐためには、歯肉上皮細胞の接着能を積極的にコントロールすることによって、破壊された接合上皮の歯面への付着を早期に修復し、さらに強固にする必要があると考える。

ヘミデスモゾーム結合の構成成分である integrin は、 α と β の 2 種のサブユニットからなるヘテロダイマーで構成され、細胞同士の接着や、細胞と ECM の接着に関与する膜蛋白質である⁷⁾。現在までに、18 種類の α 鎖と、8 種類の β 鎖が確認されており、それらの組み合わせによって、リガンド特異性の異なる 24 種類の integrin が形成される⁸⁾。また、ECM との接着により、細胞外の情報を細胞内に伝えるシグナル伝達因子として機能する一方、ECM の発現調節を行うことで、相互に細胞増殖、細胞分化、細胞死、および細胞遊走などに関与する⁹⁾。ECM は、細胞外の空間を満たす物質であると同時に、骨格的役割、細胞接着における足場の役割、そして細胞増殖因子などの液性因子を保持・提供する役割などを担い、代表的なものとして collagen, proteoglycan, fibronectin, および laminin などが挙げられる¹⁰⁾。特に、接合上皮では、5 種類の integrin ($\alpha 2\beta 1, \alpha 3\beta 1, \alpha 5\beta 1, \alpha 6\beta 4, \alpha v\beta 6$), 内側基底板では 4 種類の ECM (laminin 5, type VIII collagen, versican, tenascin C) が発現することが報告されている¹¹⁾。

これら integrin と ECM の発現は、transforming growth factor- β (TGF- β) を含むいくつかの成長因子によって調節される¹²⁾。TGF- β は細胞増殖、細胞分化、そして細胞死

などの幅広い生物活性を有するサイトカイン¹³⁾であり、そのシグナル伝達は、標的細胞膜表面のI型およびII型セリン・スレオニンキナーゼ型受容体を介して行われる¹⁴⁾。まず、TGF- β がII型受容体に結合し、複合体を形成することによって、I型受容体をリン酸化して活性化する。活性化されたI型受容体は、シグナル伝達分子Smad2およびSmad3 (Smad2/3)のC-末端配列のセリン残基をリン酸化し、さらにSmad2/3はSmad4と複合体を形成することによって核内移行する。核内でSmad複合体は標的遺伝子の転写制御領域に結合し、標的遺伝子の転写を制御し、様々な細胞応答を惹起すると考えられている¹⁵⁾。また、TGF- β シグナルには、p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)経路¹⁶⁾、extracellular signal-regulated kinase (ERK)経路¹⁷⁾やc-Jun N-terminal kinase (JNK)経路¹⁸⁾といったSmad非依存性経路もあり、Smad依存性経路と同様に多くの細胞動態を制御している。

歯肉接合上皮においては、恒常的にTGF- β 1が発現しており、T細胞とマクロファージに対する免疫抑制作用を通して抗炎症性に働き、ホメオスタシス維持の一端を担っている^{19, 20)}。また、TGF- β 1は、創傷治癒過程に血小板、好中球、マクロファージ、および線維芽細胞などから放出され、炎症反応を抑制し、細胞の増殖と分化、ECM関連蛋白質の沈着、および内皮細胞の遊走や血管新生によって、肉芽組織の形成を促進する^{13, 21)}。さらに、線維芽細胞や上皮細胞など様々な種類の細胞において、TGF- β 1

による integrin および ECM 発現調節機構が存在する¹²⁾。特に、TGF- β 1 によって、ヒト表皮角化細胞では integrin (α 2, α 5, β 6)²²⁾や fibronectin²³⁾ , そして腎臓上皮細胞では laminin α 3 β 3 γ 2²⁴⁾の発現が誘導されることが報告されている。しかしながら、硬組織と隣接するという特殊な環境に位置する歯肉上皮細胞において、TGF- β 1 が integrin と ECM に及ぼす作用や、またその詳細なシグナル伝達経路に関しては不明な点が多い。

以上のことから、歯肉上皮が歯面との接着を維持、亢進するメカニズムの解明において、TGF- β 1 と細胞接着の関係を調べることは非常に重要である。そこで、本研究では TGF- β シグナル伝達系により歯肉上皮細胞の接着を制御することを目的に、TGF- β シグナル伝達系による細胞接着能、および integrin と ECM の発現の変化を調べた。

材料と方法

1. 歯肉上皮細胞の分離・培養

健康な歯周組織を有するドナー（28歳，男性）から下顎右側智歯の抜歯時に同歯遠心頬側歯肉を採取し，研究に用いた。細胞の提供を受ける前に，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認の下（番号 975 号），使用目的などを十分に説明して同意を得た。歯肉上皮細胞は Han らの方法²⁵⁾を改変し分離した。すなわち，採取した歯肉を，迅速に No.10 メス（フェザー安全剃刀株式会社，大阪）を用いて組織を 1 mm³ 以下に粉砕し，4 mg/ml の Collagenase Type I（Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA）と 2 mg/ml の DISPASE[®]II（三光純薬株式会社，千葉）を 1:1 で混合した溶液にて 37 °C で 90 分間処理した。さらに，同溶液を遠心分離（1,200 rpm, 5 分間）し，沈殿を 60 mm セルタイト C-1（collagen type I, ウシ真皮由来）シャーレ（住友ベークライト，東京）に播種した²⁶⁾。培地は，Keratinocyte-SFM に 5 ng/ml recombinant epidermal growth factor と 50 µg/ml bovine pituitary extract（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）を添加したものをを用い，37 °C，

5 % CO₂, 100 %湿度の下で細胞培養を行った。細胞の継代には, 0.005 % Trypsin (Life Technologies) と 0.5 mM ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) (Life Technologies) との混合溶液 (trypsin-EDTA) を用いた。細胞数の調整は, 血球計算板 C-chip (NanoEnTek, Guro-gu, Seoul, South Korea) を用いて行った。3 継代後, pLenti Simian virus 40 (SV40) (Applied Biological Materials, Richmond, BC, Canada) を用いて取扱説明書に従い形質転換²⁷⁾し, 不死化ヒト歯肉上皮細胞株 (immortalized human gingival epithelial cell line ; IHGE cells) を樹立した。IHGE cells をさらに 5-7 継代培養し, 実験に使用した。

2. TGF-β シグナル阻害剤

細胞数を 3.2×10^4 cells/cm² に調整し, 6 穴プレート (Corning, Corning, NY, USA) に細胞播種した。24 時間後に 1 ng/μl Human TGF-β1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) で刺激した。TGF-β シグナル阻害剤として, TGF-β I 型受容体阻害剤 (SB431542) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), p38 MAPK 阻害剤 (SB203580), MAPK / ERK kinase (MEK) 阻害剤 (PD98059), JNK 阻害剤 (SP600125) (すべて Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を TGF-β1 刺激の 1 時間前に 10 μM 添加した。

3. 遺伝子導入

細胞数を 3.2×10^4 cells/cm² に調整し、6 穴プレートに細胞播種した。24 時間後に pcDNA3-FLAG-Smad2 (Smad2) と pcDNA3-FLAG-Smad3 (Smad3) 発現ベクター²⁸⁾ (山梨大学大学院医学工学総合研究部生化学講座第2教室の齋藤正夫准教授から供与)、および対照として Smad2 と Smad3 遺伝子を含まない pcDNA3-FLAG-mock (mock) を Lipofectamine LTX[®] & Plus Reagent (Life Technologies) を用いて取扱説明書に従い遺伝子導入した。1 穴当り Lipofectamine LTX[®] 6.25 μ l, Plus Reagent 2.5 μ l, ベクターDNA 2.5 μ g を用いた。遺伝子導入の 24 時間後に TGF- β 1 (1 ng/ μ l) で刺激した。

4. 細胞接着能の検討

TGF- β シグナル阻害実験と遺伝子導入実験において、細胞接着能を解析 (接着アッセイ) した²⁹⁾。すなわち、TGF- β 1 添加 24 時間後の細胞を trypsin-EDTA で剥離し、 3.2×10^4 cells/cm² に細胞数調整後、96 穴プレート (Corning) に再播種した。播種後、1, 12, および 24 時間の時点でプレートに付着していない細胞を phosphate buffer saline (PBS) (Life Technologies) で 3 度洗い流し、付着している細胞を pH 7.4 の 4 % Paraformaldehyde (PFA) (ナカライテスク, 京都) を含む PBS にて 10 分間浸漬固定した。次に 10 % Non-Immune Goat Serum (Life Technologies) にて 30 分間ブロッキング後、VECTASHIELD[®] Mounting Medium with DAPI

(4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて核染色し, Cellomics ArrayScan[®] VTI (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) で染色像を撮影後, 細胞数を測定した。また, ECM 基材を用いた接着能の測定は, ECM (collagen type I, fibronectin, laminin) をコートした (BD-Biocoat[™]) プレート (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) 上で行った。

5. 遺伝子発現解析

TGF- β シグナル阻害剤実験, および遺伝子導入実験において, TGF- β 1 添加 24 時間後の細胞から全 RNA を回収し, *INTEGRIN* と ECM 関連遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) 法で, 定量解析した³⁰⁾。詳細は以下の手順で行った。

- 1) 全 RNA の抽出 : 全 RNA は, シリカ膜への吸着を利用した RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出した。RNA の濃度と純度は, Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 260nm と 280nm の波長での吸光度とその比を用いて測定した。全ての RNA の純度は, 260 / 280 値が 1.9~2.1 の間である事を確認した。また, RNA 抽出過程で RNase-Free DNase Set (QIAGEN) を用いて DNA を除去した。
- 2) 逆転写反応 : 抽出した RNA 1 μ g をテンプレートとして, 50 μ M oligo (dT)₁₂₋₁₈

Primer (Life Technologies) と 10 mM dNTP Mix (Life Technologies) を 1 : 1 で溶液に混合し、65 °C で 5 分間熱処理後に氷上で 1 分間急冷反応させた。そして、5 × First Standard Buffer, 0.1 M dithiothreitol, SuperScript III Reverse Transcriptase (すべて Life Technologies) 及び RNase-free Water (QIAGEN) を 4 : 1 : 1 : 1 で混合した溶液にて、50 °C で 1 時間の逆転写反応を行って cDNA を合成した。その後、70 °C, 15 分間で逆転写酵素の不活化を行った。

- 3) プライマーの作成 : *SMAD2*, *SMAD3*, *PROLIFERATION CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA)*, *INTEGRIN ($\alpha2$, $\alpha3$, $\alpha5$, $\beta4$, $\beta6$)*, *FIBRONECTIN 1*, *TENASCIN C*, *VERSICAN*, *LAMININ ($\alpha1$, $\gamma2$)*, そして *GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (GAPDH)* の PCR プライマーをオンラインソフトウェアである Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) を用いて合成した (表 1)。
- 4) リアルタイム RT-PCR 法 : PCR 反応は、cDNA 合成後の反応液を 10 倍希釈した溶液を、上記で作成したセンスならびにアンチセンス PCR プライマー (10 μ M), 2 × Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), および RNase-free Water と混合し、95 °C で 10 分間の初期変性の後、95 °C で 15 秒, 60 °C で 1 分のステップでアニーリングと伸長反応を 40 サイクル行った。この反応は 7300 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて行い、

その際に PCR 産物が発する蛍光量を SDS v1.X with RQ Software (Life Technologies) にて測定した。なお、内部対照は *GAPDH* の mRNA 量とした。

6. 蛋白質の細胞内局在の観察および蛍光強度の解析

遺伝子導入実験において、TGF- β 1 添加 24 時間後の細胞を、pH 7.4, 4 %PFA で 10 分間浸漬固定した。次に細胞膜透過処理として、100 %メタノールにて 10 分間、-20 °C で処理し、その後 10 % Non-Immune Goat Serum にて 30 分間ブロッキング後、一次抗体として、抗 FLAG マウスモノクローナル抗体 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 抗 PHOSPHO-SMAD2 (P-SMAD2) ラビットポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 抗 INTEGRIN α 2 マウスモノクローナル抗体 (R&D Systems), 抗 INTEGRIN α 5 マウスモノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, UK), 抗 INTEGRIN β 4 マウスモノクローナル抗体 (Abcam), 抗 INTEGRIN β 6 マウスモノクローナル抗体 (R&D Systems) の何れかを PBS にて 1 : 100 の濃度に希釈した溶液を、4 °C で 12 時間反応させた。次に、二次抗体として赤色の蛍光を示す Alexa Fluor[®] 594 ゴート抗ラビット IgG 抗体 (Life Technologies) と緑色の蛍光を示す Alexa Fluor[®] 488 ゴート抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies) をそれぞれ PBS にて 1 : 500 の濃度に希釈した後に室温にて 30 分間反応させた。その後、核の染色として VECTASHIELD[®] Mounting Medium with DAPI を用いて室

温，10 分間反応させ，染色した細胞を Cellomics ArrayScan[®] VTI で，20 倍の対物レンズを用いて，免疫蛍光染色法で細胞内の蛋白質局在を観察した。Cellomics ArrayScan[®] VTI は，蛍光染色を画像化し，細胞のサイズ，形，および蛍光強度を数値データへと自動変換する画像解析モジュールを取り付けた自動蛍光顕微鏡イメージングシステムであるので，変換された数値データを用いることによって，染色した蛋白質に関して，蛍光強度の解析³¹⁾を行った。すなわち，Cellomics View ソフトウェアを用いて，1 穴あたり 1,000 個の細胞の染色画像を記録し，DAPI 陽性核の数および細胞内の平均蛍光強度を数値化し，陽性率を算出した。なお，1 次抗体を反応させない陰性対象の総細胞数の 1%が陽性となる蛍光強度を下限とした。

7. 統計処理

全ての実験結果は，独立した 3~5 回の実験系 ($n=3\sim5$) から得た。3 群間以上の検定は，ANOVA および Scheffe's test を用いて検定した。2 群間の差の検定には，Student's *t*-test を用いた。なお，*p* 値が 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

結果

1. TGF- β シグナルが細胞接着に及ぼす影響

TGF- β が細胞接着能に及ぼす影響、またその影響が Smad 依存性あるいは非依存性何れの経路を伝達するのかを、各種シグナル特異的阻害剤を用いた接着アッセイにより調べた。TGF- β 1 で 24 時間刺激した細胞を再播種すると、1 時間後において、無刺激対照と比較して接着細胞数が有意に増加した。そして、この TGF- β 1 による接着細胞数の増加は、1 時間後では SB431542 と PD98059、および SP600125 によって、12 時間後では SB431542 によって、24 時間後では SB431542 と SB203580、および SP600125 によって無刺激対照レベルまで有意に抑制された。特に、1 時間後において、SB431542 の添加は他の阻害剤と比較しても接着細胞数を著しく抑制した (図 1)。

2. TGF- β -Smad2/3 シグナルによる *INTEGRIN* と ECM 関連遺伝子の発現調節

TGF- β 1 誘導性の歯肉上皮細胞の接着能上昇が TGF- β I 型受容体/Smad シグナルに依存性であったことから、*INTEGRIN* と ECM 関連遺伝子の発現に対する TGF- β 1,

および SB431542 の影響を，リアルタイム RT-PCR 法によって定量的に調べた。歯肉接合上皮に発現している integrin と ECM に¹¹⁾，代表的なものも加えて解析を行った。TGF- β 1 の刺激 24 時間において，*INTEGRIN* (α 2, α 5, β 4, β 6), *FIBRONECTIN 1*, *TENASCIN C*, *VERSICAN*, および *LAMININ* γ 2 の発現は有意に増加した。TGF- β 1 によるこれら遺伝子発現の増加は，SB431542 の添加によって有意に無刺激対照レベルまで抑制された。また，*INTEGRIN* α 3 と *LAMININ* α 1 は TGF- β 1 によって遺伝子発現の増減は示さず，SB431542 の添加によっても著明な変化はなかった。(図 2A, B)

3. Smad2 および Smad3 過剰発現細胞の確立

1) FLAG による遺伝子導入効率の確認

Smad2 と Smad3 が細胞接着に及ぼす影響を調べるため，対照として mock と Smad2 発現および Smad3 発現ベクターの遺伝子導入を行った。ベクターの細胞内への導入を確認するために，1 次抗体として抗 FLAG 抗体を用いて Cellomics ArrayScan[®] VTI により免疫蛍光染色を行った。何れの遺伝子を導入した細胞においても，細胞質内で FLAG 染色が陽性であった (図 3A)。また，蛍光強度解析から，各導入細胞における FLAG 染色陽性率 (遺伝子導入効率) は約 40% であり，各群間に有意な差はなかった (図 3B)。

2) 遺伝子導入による *SMAD2/3* の発現確認

遺伝子導入細胞における *SMAD2/3* の発現量をリアルタイム RT-PCR 法によって定量的に調べた。Smad2 発現ベクター導入によって、*SMAD2* の発現量は有意に増加し、*SMAD3* の発現量には変化がなかった。Smad3 発現ベクター導入によって、*SMAD3* の発現量は有意に増加した。また、*SMAD2* の発現量も有意に増加した (図 4A)。

3) 遺伝子導入による細胞増殖への影響

遺伝子導入細胞における細胞増殖への影響を調べるため、*PCNA* の発現量をリアルタイム RT-PCR 法によって定量的に調べた。細胞増殖マーカーである *PCNA* は、DNA ポリメラーゼ δ の補助蛋白質であり、細胞周期の G1 期から S 期において最も増加し、DNA 合成と細胞増殖に関与する。Smad2 発現ベクター導入によって、*PCNA* の発現は減少傾向を示し、Smad3 発現ベクター導入によって有意に減少した (図 4B)。

4. Smad2/3 過剰発現が細胞接着に及ぼす影響

Smad2 および Smad3 過剰発現による細胞接着への影響を、接着アッセイにより調べた。遺伝子導入の 24 時間後に TGF- β 1 で刺激を行い、その 24 時間後の細胞を再播種すると、対照と比較して、1 時間後では接着細胞数の変化はなかった。そ

して、12 時間後では Smad2 と Smad3 過剰発現細胞の接着細胞数が有意に増加した。

しかし、24 時間後では Smad3 過剰発現細胞の接着細胞数が有意に減少した (図 5)。

5. Smad2/3 過剰発現による *INTEGRIN* と ECM 関連遺伝子の発現調節

Smad2 および Smad3 過剰発現による、*INTEGRIN* と ECM 関連遺伝子の発現への影響を、リアルタイム RT-PCR 法によって定量的に調べた。遺伝子導入の 24 時間後に TGF- β 1 で刺激を行い、その 24 時間後の全 RNA を用いた。Smad2 過剰発現細胞において、*INTEGRIN* (α 2, α 5, β 4) の発現は対照と比較して有意に増加し、*INTEGRIN* β 6 の発現は、増加傾向を示したが、有意な差ではなかった。Smad3 過剰発現細胞において、*INTEGRIN* の発現は対照と比較すると著明な変化はなかったが、Smad2 過剰発現細胞と比較すると *INTEGRIN* β 6 の発現のみ有意に減少した (図 6A)。

一方、ECM 関連遺伝子の発現では、Smad2 過剰発現細胞において、対照と比較して *FIBRONECTIN 1* と *LAMININ* γ 2 の発現は増加傾向を示したが、有意な差はなかった。ただし、*TENASCIN C* の発現は、有意に減少した。Smad3 過剰発現細胞における ECM 関連遺伝子の発現は、対照と比較して著明な変化はなかった (図 6B)。

6. Smad2 過剰発現による P-SMAD2 と *INTEGRIN* 蛋白質への影響

上記結果に基づいて、*INTEGRIN* の発現の増加が著明であった Smad2 過剰発現細胞における、P-SMAD2 および *INTEGRIN* の細胞内局在を調べた。1 次抗体として

P-SMAD2, INTEGRIN ($\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 4$, $\beta 6$) に対する特異抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。Smad2 過剰発現細胞において、対照と比較して INTEGRIN ($\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 4$, $\beta 6$) 染色 (緑色) が細胞内で強く陽性を示した。また、それらの強い INTEGRIN 染色は、核内に P-SMAD2 染色 (赤色) が陽性であった細胞において共局在を示した (図 7A)。蛍光強度解析については、Smad2 過剰発現細胞において、対照と比較して INTEGRIN ($\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 4$, $\beta 6$) の蛍光強度が増加傾向を示した。特に、INTEGRIN $\alpha 2$ は有意に増加しており、INTEGRIN $\alpha 5$ は著明な増加傾向を示したが、ばらつきが大きいため有意な差はなかった (図 7B)。

7. ECM 存在下での、Smad2/3 過剰発現が細胞接着に及ぼす影響

Smad2 過剰発現細胞において、INTEGRIN の発現が増加した為、そのリガンドである ECM の刺激を加えた状態での細胞接着に及ぼす影響を調べた。ECM 刺激として、ECM をコートしたプレートを用いた。Smad2 および Smad3 過剰発現細胞では、collagen type I, fibronectin, および laminin をコートしたプレートのすべてで、接着細胞数が増加傾向にあった。特に Smad2 過剰発現細胞においては著明であり、fibronectin プレートでは有意に増加し、laminin プレートでは有意差はないものの顕著に増加した (図 8)。

考察

TGF- β による integrin と ECM 制御を介した接着機構については多くの報告がある¹²⁾。しかしながら、そのシグナル伝達経路に関しての報告は少なく、特に歯面の内側基板と歯肉接合上皮の接着制御メカニズムに関しては不明な点が多い。本研究では、歯肉上皮細胞における TGF- β シグナル伝達経路に着目して、Smad 依存性経路と Smad 非依存性経路、さらに Smad2 と Smad3 シグナル伝達経路の差異が細胞接着能、そして integrin と ECM の発現に与える影響を明らかにした。

TGF- β シグナルによる細胞接着能への影響がどのシグナル伝達経路に依存しているかを調べるために、Smad 依存性経路と Smad 非依存性経路の主要な阻害剤を用いて、接着アッセイを行った。TGF- β 1 により、接着細胞数は著明に増加した。また、1 時間後および 12 時間後の接着アッセイにおいて、SB431542 による接着細胞数の抑制が顕著であった (図 1)。この SB431542 は、TGF- β I 型受容体である activin receptor-like kinase (ALK 4, 5, 7) 受容体の特異的阻害剤であり、Smad2/3 シグナル伝達経路を遮断する。本研究の結果は、TGF- β 1-Smad2/3 シグナルに細胞接着が依存している可能

性を示しており、このことはマウス乳腺上皮細胞において TGF- β 1 の刺激により接着能が上昇しているという報告³²⁾や、ヒト血管内皮細胞において Smad2/3 の活性化を抑制することにより接着能が低下しているという報告³³⁾と、細胞種は異なるが一致する。すなわち、IHGE cells における TGF- β 1 の細胞接着能上昇メカニズムは、TGF- β シグナル伝達経路の中でも、特に TGF- β -Smad2/3 シグナルに関与していることを示した。

次に、TGF- β -Smad2/3 シグナルをターゲットとして、TGF- β 1 と Smad2/3 の阻害が *INTEGRIN* と ECM 関連遺伝子に与える影響をリアルタイム RT-PCR 法によって定量的に調べた。TGF- β 1 により、*INTEGRIN* (α 2, α 5, β 4, β 6), *FIBRONECTIN 1*, *TENASCIN C*, *VERSICAN*, および *LAMININ* γ 2 の発現が増加した。そして、Smad2/3 の阻害によって、上述の *INTEGRIN* と ECM 関連遺伝子の発現は抑制された。一方で、*INTEGRIN* α 3 と *LAMININ* α 1 は TGF- β シグナルに依存しなかった (図 2A, B)。これらの結果は、ヒト皮膚表皮角化細胞において、TGF- β 1 によって、*integrin* (α 2, α 5, β 6) の発現が増加し、*integrin* α 3 の発現は減少傾向を示した²²⁾という報告と一致している。すなわち、上皮細胞における *integrin* サブユニットの TGF- β 1 による特異的制御メカニズムの可能性がある。

TGF- β -Smad2/3 シグナルの伝達経路を介する多くの細胞機能が解明されているが、Smad2 と Smad3 のどちらが主に調節しているのかは未だ明確ではない。また、細胞

種によって、すなわち上皮細胞と線維芽細胞とでは、シグナル伝達による細胞応答は異なることが知られている³⁴⁾。Smad2 ノックアウトマウスは胎生7日で胚致死となる³⁵⁾が、Smad3 ノックアウトマウスは生後1-8ヵ月後に免疫不全により死亡する³⁶⁾。そのため、Smad2 は発生のより初期に重要と考えられる。しかしながら、Smad3 遺伝子の欠失が TGF- β によるシグナル伝達を停止させた³⁷⁾ことや、Smad2 でなく Smad3 発現の阻害が TGF- β 誘導性の細胞周期調節を阻害した³⁸⁾ことから、Smad3 がより重要であるという報告³⁹⁾もある。そこで、本研究に用いたヒト歯肉上皮細胞由来の IHGE cells において、細胞接着に関わる TGF- β シグナルを Smad2 と Smad3 のいずれか、もしくは両者かの伝達経路が制御するのかを調べた。すなわち、Smad2 と Smad3 発現ベクターの遺伝子導入を行い、Smad2 と Smad3 過剰発現が細胞接着へ与える影響を解析した。

Smad2 発現ベクター導入によって、SMAD2 の発現量は有意に増加した。一方で、Smad3 発現ベクター導入によって、SMAD2 と SMAD3 の発現量が有意に増加した (図4A)。以上の結果は SMAD3 が内在性の SMAD2 の発現を増加させるのに対して、SMAD2 は SMAD3 の発現に影響を与えないことを示しており、すなわち SMAD3 が SMAD2 の転写調節に関与している可能性を示唆している。

Smad2/3 過剰発現による細胞接着能の解析では、Smad2/3 過剰発現によって接着細

胞数が増加した。12 時間後の接着アッセイで Smad2 過剰発現によって接着細胞数が有意に増加した。しかし、24 時間後では、Smad2 過剰発現では接着細胞数の変化が見られず、Smad3 の接着細胞数は減少していた (図 5)。細胞増殖マーカーである PCNA の遺伝子発現が Smad2, Smad3 過剰発現によって減少傾向にあること (図 4B), また Smad2/3 は細胞周期 G1 期の制御に関わる cyclin-dependent kinase (CDK) の阻害物質である p15 発現を亢進させ細胞の増殖を抑制する⁴⁰⁾ことから、Smad2 あるいは Smad3 過剰発現は IHGE cells の増殖抑制を起こしたためと考える。すなわち、24 時間後において、対照では細胞増殖することで総細胞数が増加するが、Smad2/3 過剰発現では増殖抑制の結果として総細胞数が少ないことから、実際は Smad2/3 過剰発現で接着細胞数は増加していた可能性がある。今後、他の細胞増殖マーカーや細胞周期マーカーを確認することで、このことが確実になると考える。

Smad2/3 過剰発現による接着細胞数の増加に影響を与えた *INTEGRIN* をリアルタイム RT-PCR 法によって定量的に調べた。Smad2 過剰発現により、*INTEGRIN* ($\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 4$) の発現は有意に増加し、*INTEGRIN* $\beta 6$ の発現は増加傾向を示したが、有意な差はなかった。また、Smad3 過剰発現により、著明な変化はなかった (図 6A)。さらに、遺伝子発現が確認できた *INTEGRIN* に関して蛋白質での解析を行った。Smad2 過剰発現により、*INTEGRIN* ($\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 4$, $\beta 6$) 蛋白質量は増加傾向を示した (図 7B)。ま

た、核内に P-SMAD2 発現のある細胞において INTEGRIN 発現が強かった (図 7A) ことから、P-SMAD2 と INTEGRIN の間に強い関連があることが考えられた。このことに関して、CLIC (塩素細胞内チャンネル蛋白質) 4^{NULL} マウスの創傷治癒過程で P-Smad2 の減少と integrin β 4 の低下が同時に起こる⁴¹⁾という報告がある。しかしながら、Smad2 シグナル伝達と integrin の発現制御メカニズムは関連づけられておらず、さらなる解明が必要と考える。

ECM 関連遺伝子の発現では、Smad2 過剰発現により、*FIBRONECTIN 1* と *LAMININ* γ 2 では増加傾向を示したが、有意な差はなかった。また、Smad3 過剰発現により、著明な変化はなかった (図 6B)。TGF- β シグナルによる ECM 発現調節は、ECM の産生・分泌および沈着の促進、さらに分解の抑制と、多岐に渡る¹²⁾と考えられている。ECM の分解調節には、蛋白質分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP) と、その MMP と複合体を形成し MMP の活性化を阻害する tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) が関与しており、いずれも TGF- β が発現調節に関わっている⁴²⁾。また、TGF- β 1 の活性化に関わる integrin β 6 のノックアウトマウスの歯肉上皮細胞では、MMP-2 と MMP-9 の発現が増加している¹⁹⁾ことが報告されている。今後、Smad2/3 過剰発現による ECM 調節の全体像を検討するためには、MMP や TIMP を含めた ECM 分解制御のメカニズムも解明する必要がある。

Smad2/3 過剰発現において、integrin 発現の増加が確認できたため、リガンドである ECM 存在下で、細胞接着能はどのように変化するのかを解析した。Smad2/3 過剰発現により、fibronectin と laminin のリガンドで、特に接着細胞数が増加した。また、Smad3 に比べて Smad2 過剰発現の方がより差が顕著であった (図 8)。Smad2 過剰発現によって発現が増加した integrin では、integrin $\alpha 2$ は主に collagen type I と結合して細胞の接着や遊走をさせることによって創傷治癒後の組織修復に関与し⁴³⁾、integrin $\alpha 5$ は fibronectin と結合することによって TGF- β II 型受容体の発現を誘導し⁴⁴⁾、integrin $\beta 6$ は潜在型 TGF- $\beta 1$ の Latency associated protein (LAP) と結合することで、TGF- $\beta 1$ を活性化へと導く¹⁹⁾と、報告されている。さらに、integrin $\beta 4$ と laminin 5 は両者が結合してヘミデスモゾーム結合を形成するので細胞接着に関与する⁴⁵⁾と報告されている。本研究において、リガンドである fibronectin と laminin をコートしたプレートを用いると IHGE cells の接着が顕著に上昇したことから、歯肉上皮細胞の接着には integrin ($\alpha 5$, $\beta 4$, $\beta 6$) が特に重要であることが言える。すなわち、Smad2 過剰発現は、integrin $\alpha 2$ と integrin $\beta 4$ の発現増加によって細胞接着を亢進させる経路のみならず、integrin $\alpha 5$ と integrin $\beta 6$ の発現を増加することで TGF- β シグナルを活性化させる経路により協調して、さらに細胞接着を亢進させる可能性が示唆された (図 9)。

歯周組織の再生には、歯肉のコラーゲン線維が歯質に陥入する結合織性の新付着が

必要であるが、実際は歯肉上皮のターンオーバーが歯槽骨などの歯周組織よりも早い
ために⁴⁶⁾、歯周治療後の治癒形態は、歯肉上皮が深行増殖した長い上皮性付着による
ものとなる⁹⁾。つまり、歯肉上皮の治癒は歯根膜や歯槽骨など間葉系組織の再生を阻
害してしまうという矛盾が生じる。以上のことから、歯周組織の再生において、骨内
欠損部に間葉系組織を再生させる場を確保するために、歯肉上皮の深行増殖を抑制す
ることが必要と考える。創傷治癒の再上皮化過程において、周囲組織から産生される
TGF- β 1 が上皮細胞に作用することによって、増殖及び遊走の抑制を引き起こし、再
上皮化は遅延する⁴⁷⁾。また、富川ら⁴⁸⁾は、Smad2 を上皮特異的に過剰発現させたト
ランスジェニック (K14-Smad2) マウスでは、keratin 16 の発現を減少させることで、
上皮の遊走を抑制し、口蓋歯肉創傷部において再上皮化を抑制することを報告した。
すなわち、本研究の結果を踏まえると、TGF- β -Smad2 シグナルは歯肉上皮の増殖と遊
走を抑制し、かつ、歯肉接合上皮の歯面への接着を亢進するという、歯周組織再生に
とって重要な上皮の深行増殖の抑制に関わる理想的なシグナル伝達といえる (図 9)。

本研究で明らかになった歯肉上皮における Smad2 過剰発現による integrin 発現増加
について、さらなるメカニズム解明のために、Smad2 と協調的に機能する Smad の補
助因子の同定や、K14-Smad2 マウスを用いた歯肉接合上皮の深行増殖の抑制を調べ
ることによって、歯周炎の予防のみならず、効率的な歯周組織再生を導くことができ

ると考える。

結論

歯肉上皮細胞において、TGF- β -Smad2/3 シグナル伝達経路が細胞接着に関与し、特に Smad2 の過剰発現は細胞接着能を上昇させる。また、そのメカニズムには、Smad2 による integrin (α 2, α 5, β 4) の発現増加が関与している。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に心から感謝致します。また，pcDNA3-FLAG-Smad2 および pcDNA3-FLAG-Smad3 発現ベクターをご提供下さった山梨大学大学院医学工学総合研究部生化学講座第2教室の齋藤正夫准教授，様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました，岡山大学病院歯周科の山本直史講師，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の山城圭介助教，下江正幸博士（現，国立療養所邑久光明園歯科医師），富川和哉博士（現，九州大学病院口腔総合診療科助教），鶴川祐樹博士（現，国立療養所大島青松園歯科医師），高知信介先生，ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Cochran, D. L. and Wozney, J. M.: Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol. 2000*, 19, 40-58, 1999.
- 2) Schroeder, H. E. and Listgarten, M. A.: The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol. 2000*, 13, 91-120, 1997.
- 3) 特定非営利活動法人 日本歯周病学会「歯周病の診断と治療の指針 2007」, 2007.
- 4) Kinumatsu, T., Hashimoto, S., Muramatsu, T., Sasaki, H., Jung, H. S., Yamada, S. and Shimono, M.: Involvement of laminin and integrins in adhesion and migration of junctional epithelium cells. *J. Periodontal. Res.*, 44, 13-20, 2009.
- 5) Bosshardt, D. D. and Lang, N. P.: The junctional epithelium: from health to disease. *J. Dent. Res.*, 84, 9-20, 2005.
- 6) Pöllänen, M. T., Salonen, J. I. and Uitto, V. J.: Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontol. 2000*, 31, 12-31, 2003.
- 7) Hynes, R. O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-687,

2002.

- 8) Takada, Y., Ye, X. and Simon, S.: The integrins. *Genome Biol.*, 8:215-223, 2007.
- 9) Gräber, H. G., Conrads, G., Wilharm, J. and Lampert, F.: Role of interactions between integrins and extracellular matrix components in healthy epithelial tissue and establishment of a long junctional epithelium during periodontal wound healing: a review. *J. Periodontol.*, 70, 1511-1522, 1999.
- 10) De Arcangelis, A. and Georges-Labouesse, E.: Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet.*, 16, 389-395, 2000.
- 11) Larjava, H., Koivisto, L., Häkkinen, L. and Heino, J.: Epithelial integrins with special reference to oral epithelia. *J. Dent. Res.*, 90, 1367-1376, 2011.
- 12) Margadant, C. and Sonnenberg, A.: Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO. Rep.*, 11, 97-105, 2010.
- 13) Werner, S. and Grose, R.: Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.*, 83, 835-870, 2003.
- 14) Wrana, J. L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F. and Massagué, J.: TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*, 71, 1003-1014, 1992.

- 15) Heldin, C. H., Miyazono, K. and ten Dijke, P.: TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, **390**, 465-471, 1997.
- 16) Yu, L., Hébert, M. C. and Zhang, Y. E.: TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO. J.*, **21**, 3749-3759, 2002.
- 17) Yue, J. and Mulder, K. M.: Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol. Biol.*, **142**, 125-131, 2000.
- 18) Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K. and Moses, H. L.: Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37413-37420, 1999.
- 19) Ghannad, F., Nica, D., Fulle, M. I., Grenier, D., Putnins, E. E., Johnston, S., Eslami, A., Koivisto, L., Jiang, G., McKee, M. D., Häkkinen, L. and Larjava, H.: Absence of alphavbeta6 integrin is linked to initiation and progression of periodontal disease. *Am. J. Pathol.*, **172**, 1271-1286, 2008.
- 20) Brandes, M. E., Wakefield L. M. and Wahl, S. M.: Modulation of monocyte type I transforming growth factor-beta receptors by inflammatory stimuli. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19697-19703, 1991.
- 21) Häkkinen, L., Uitto, V. J. and Larjava, H.: Cell biology of gingival wound healing.

Periodontol. 2000, 24, 127-152, 2000.

- 22) Zambruno, G., Marchisio, P. C., Marconi, A., Vaschieri, C., Melchiori, A., Giannetti, A. and De Luca M.: Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J. Cell Biol.*, 129, 853-865, 1995.
- 23) Nickoloff, B. J., Mitra, R. S., Riser, B. L., Dixit, V. M. and Varani, J.: Modulation of keratinocyte motility. Correlation with production of extracellular matrix molecules in response to growth promoting and antiproliferative factors. *Am. J. Pathol.*, 132, 543-551, 1988.
- 24) Moyano, J. V., Greciano, P. G., Buschmann, M. M., Koch, M. and Matlin, K. S.: Autocrine transforming growth factor- β 1 activation mediated by integrin α V β 3 regulates transcriptional expression of laminin-332 in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*, 21, 3654-3668, 2010.
- 25) Han, Y. W., Shi, W., Huang, G. T., Kinder Haake, S., Park, N. H., Kuramitsu, H. and Genco, R. J.: Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect. Immun.*, 68, 3140-3146, 2000.

- 26) Fujita, T., Yumoto, H., Shiba, H., Ouhara, K., Miyagawa, T., Nagahara, T., Matsuda, S., Kawaguchi, H., Matsuo, T., Murakami, S. and Kurihara, H.: Irsogladine maleate regulates epithelial barrier function in tumor necrosis factor- α -stimulated human gingival epithelial cells. *J. Periodontal. Res.*, **47**, 55-61, 2012.
- 27) Wong, S. Y., Seol, A. D., So, P. L., Ermilov, A. N., Bichakjian, C. K., Epstein, E. H. Jr., Dlugosz, A. A. and Reiter, J. F.: Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nat. Med.*, **15**, 1055-1061, 2009.
- 28) Meng, X. M., Huang, X. R., Chung, A. C., Qin, W., Shao, X., Igarashi, P., Ju, W., Bottinger, E. P. and Lan, H. Y.: Smad2 protects against TGF-beta/Smad3-mediated renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **21**, 1477-1487, 2010.
- 29) Margadant, C., Raymond, K., Kreft, M., Sachs, N., Janssen, H. and Sonnenberg, A.: Integrin alpha3beta1 inhibits directional migration and wound re-epithelialization in the skin. *J. Cell Sci.*, **122**, 278-288, 2009.
- 30) Ogura, N., Akutsu, M., Tobe, M., Sakamaki, H., Abiko, Y. and Kondoh, T.: Microarray analysis of IL-1beta-stimulated chemokine genes in synovial fibroblasts from human TMJ. *J. Oral. Pathol. Med.*, **36**, 223-228, 2007.
- 31) Breier, J. M., Radio, N. M., Mundy, W. R. and Shafer, T. J.: Development of a

- high-throughput screening assay for chemical effects on proliferation and viability of immortalized human neural progenitor cells. *Toxicol. Sci.*, **105**, 119-133, 2008.
- 32) Gervasi, M., Bianchi-Smiraglia, A., Cummings, M., Zheng, Q., Wang, D., Liu, S. and Bakin, A.V.: JunB contributes to Id2 repression and the epithelial-mesenchymal transition in response to transforming growth factor- β . *J. Cell. Biol.*, **196**, 589-603, 2012.
- 33) Fu, J., Wang, W., Liu, Y. H., Lu, H. and Luo, Y.: In vitro anti-angiogenic properties of LGD1069, a selective retinoid X-receptor agonist through down-regulating Runx2 expression on Human endothelial cells. *BMC. Cancer*, **11**,227-238, 2011.
- 34) Yang, Y. A., Tang, B., Robinson, G., Hennighausen, L., Brodie, S. G., Deng, C. X. and Wakefield, L.M.: Smad3 in the mammary epithelium has a nonredundant role in the induction of apoptosis, but not in the regulation of proliferation or differentiation by transforming growth factor-beta. *Cell Growth Differ.*, **13**, 123-130, 2002.
- 35) Nomura, M. and Li, E.: Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature*, **393**, 786-790, 1998.
- 36) Yang, X., Letterio, J. J., Lechleider, R. J., Chen, L., Hayman, R., Gu, H., Roberts, A. B. and Deng, C.: Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and

- diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO. J.*, 18, 1280-1291, 1999.
- 37) Xu, G., Chakraborty, C. and Lala, P.K.: Expression of TGF-beta signaling genes in the normal, premalignant, and malignant human trophoblast: loss of smad3 in choriocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14, 47-55, 2001.
- 38) Kretschmer, A., Moepert, K., Dames, S., Sternberger, M., Kaufmann, J. and Klippel, A.: Differential regulation of TGF-beta signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Oncogene*, 22, 6748-6763, 2003.
- 39) Brown, K. A., Pietenpol, J.A. and Moses, H. L.: A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J. Cell Biochem.*, 101, 9-33, 2007.
- 40) Feng, X. H., Lin, X. and Derynck, R.: Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO. J.*, 19, 5178-5193, 2000.
- 41) Padmakumar, V. C., Speer, K., Pal-Ghosh, S., Masiuk, K. E., Ryscavage, A., Dengler, S. L., Hwang, S., Edwards, J. C., Coppola, V., Tessarollo, L., Stepp, M. A. and Yuspa, S. H.: Spontaneous skin erosions and reduced skin and corneal wound healing characterize CLIC4 (NULL) mice. *Am. J. Pathol.*, 181, 74-84, 2012.

- 42) Bujak, M. and Frangogiannis, N.G.: The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.*, **74**, 184-195, 2007.
- 43) Grenache, D. G., Zhang, Z., Wells, L. E., Santoro, S. A., Davidson, J. M. and Zutter, M. M.: Wound healing in the alpha2beta1 integrin-deficient mouse: altered keratinocyte biology and dysregulated matrix metalloproteinase expression. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 455-466, 2007.
- 44) Wang, D., Sun, L., Zborowska, E., Willson, J. K., Gong, J., Verraraghavan, J. and Brattain, M. G.: Control of type II transforming growth factor-beta receptor expression by integrin ligation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12840-12847, 1999.
- 45) Sugisawa, M., Masaoka, T., Enokiya, Y., Muramatsu, T., Hashimoto, S., Yamada, S. and Shimono, M.: Expression and function of laminin and integrins on adhesion/migration of primary culture cells derived from rat oral epithelium. *J. Periodontal. Res.*, **45**, 284-291, 2010.
- 46) Engler, W. O., Ramfjord, S. P. and Hiniker, J. J.: Healing following simple gingivectomy. A tritiated thymidine radioautographic study. Epithelialization. *J. Periodontol.*, **37**, 298-308, 1966.
- 47) Yang, L., Chan, T., Demare, J., Iwashina, T., Ghahary, A. and Scott, P. G., Tredget E.

E.: Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in the epidermis. *Am. J. Pathol.*, **159**, 2147-2157, 2001.

- 48) Tomikawa, K., Yamamoto, T., Shiomi, N., Shimoe, M., Hongo, S., Yamashiro, K., Yamaguchi, T., Maeda, H. and Takashiba, S.: Smad2 decelerates re-epithelialization during gingival wound healing. *J. Dent. Res.*, **91**, 764-770, 2012.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座

歯周病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- 第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会（2011 年 9 月，下関）
- 第 55 回日本歯周病学会春季学術大会（2012 年 5 月，札幌）

図の説明

図 1. TGF- β シグナルが細胞接着に及ぼす影響

TGF- β 1 刺激 24 時間後の細胞を回収，細胞数調整後に再播種し，1，12，および 24 時間後に付着していない細胞を PBS で洗い流し，付着している細胞数を DAPI 染色後測定した。阻害剤は，TGF- β 1 刺激の 1 時間前に添加した。

阻害剤：SB431542，TGF- β I 型受容体阻害剤；SB203580，p38 MAPK 阻害剤；

PD98059，MEK 阻害剤；SP600125，JNK 阻害剤

独立した 5 回の実験結果の平均値を示し，エラーバーは標準偏差を示す。対照である TGF- β 1 刺激のみの細胞数を基準 (=1) とした比を算出した。

* : $p < 0.05$ ，ANOVA および Scheffe's test

図 2. TGF- β -Smad2/3 シグナルによる *INTEGRIN* と ECM 関連遺伝子の発現調節

SB431542 (TGF- β I 型受容体阻害剤) を添加して 1 時間後に TGF- β 1 刺激し，その 24 時間後に全 RNA を回収して，リアルタイム RT-PCR 法によって定量した。

A) *INTEGRIN* ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 4$, $\beta 6$) の発現

B) ECM である *FIBRONECTIN 1*, *TENASCIN C*, *VERSICAN*, および *LAMININ* ($\alpha 1$,

γ 2) の発現

独立した 4 回の実験結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。すべての発現量は、内部対照の *GAPDH* の発現量で補正し、対照である TGF- β 1 刺激のみの発現量を基準 (=1) とした比を算出した。

* : $p < 0.05$, ANOVA および Scheffe's test

図 3. Smad2 と Smad3 発現ベクターの遺伝子導入

Smad2 あるいは Smad3 の遺伝子を発現ベクター (pcDNA3-FLAG) を用いて導入した。24 時間後に TGF- β 1 で刺激し、さらに 24 時間後の細胞を抗 FLAG 抗体 (緑) と DAPI (青) を用いて蛍光染色した。

mock : 発現ベクターのみ

A) FLAG による遺伝子導入の確認

独立した 3 回の実験結果の代表例を示し、スケールバーは 100 μ m を示す。

B) 各ベクターを導入した細胞 1,000 個当りの FLAG 染色の陽性率 (導入効率)

独立した 3 回の実験結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

図 4. 遺伝子導入による SMAD2/3, PCNA の発現確認

遺伝子導入 24 時間後に TGF- β 1 で刺激し、その 24 時間後の全 RNA を回収して、リアルタイム RT-PCR 法によって定量した。

A) *SMAD2* と *SMAD3* の発現

B) *PCNA* の発現

独立した 4 回の実験結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。遺伝子の発現量は、*GAPDH* の発現量で補正し、対照である mock（発現ベクターのみ）の発現量を基準（=1）とした比を算出した。

* : $p < 0.05$, ANOVA および Scheffe's test

図 5. Smad2/3 過剰発現が細胞接着に及ぼす影響

遺伝子導入 24 時間後に TGF- β 1 で刺激を行い、その 24 時間後の細胞を回収し、細胞数を調整して再播種した。その後、1, 12, および 24 時間後に付着している細胞数を測定した。

独立した 3 回の実験結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。対照である mock（発現ベクターのみ）の細胞数を基準（=1）とした比を算出した。

* : $p < 0.05$, ANOVA および Scheffe's test

図 6. Smad2/3 過剰発現による *INTEGRIN* と ECM 関連遺伝子の発現調節

遺伝子導入 24 時間後に TGF- β 1 で刺激し、その 24 時間後の全 RNA を回収して、リアルタイム RT-PCR 法によって定量した。

A) *INTEGRIN* (α 2, α 5, β 4, β 6) の発現

B) *FIBRONECTIN 1*, *TENASCIN C*, *VERSICAN*, および *LAMININ* γ 2 の発現

独立した 4 回の実験結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。すべての発現量は、*GAPDH* の発現量で補正し、対照である mock (発現ベクターのみ) の発現量を基準 (=1) とした比を算出した。

* : $p < 0.05$, ANOVA および Scheffe's test

図 7. Smad2 過剰発現による P-SMAD2, *INTEGRIN* 蛋白質の細胞内局在の観察および

蛍光強度の解析

遺伝子導入 24 時間後に TGF- β 1 で刺激を行い、その 24 時間後の細胞を用いた。

A) 各タンパクの細胞内局在 : *INTEGRIN* (α 2, α 5, β 4, β 6), 緑色 ; P-Smad2, 赤色 ; DAPI, 青色

独立した 4 回の実験結果の代表例を示し、スケールバーは 100 μ m を示す。

B) 蛍光強度から細胞 1,000 個当りの抗 *Integrin* 抗体陽性率

独立した4回の実験結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。対照である mock（発現ベクターのみ）の発現率を基準（=1）とした比を算出した。

* : $p < 0.05$, Student's *t*-test

図 8. ECM 存在下での Smad2/3 過剰発現が細胞接着に及ぼす影響

ECM 存在下での Smad2/3 過剰発現による細胞接着能への影響を解析するために、ECM (collagen type I, fibronectin, laminin) でコートしたプレートを用いた。遺伝子導入 24 時間後に TGF- β 1 で刺激を行い、その 24 時間後の細胞を回収し、細胞数を調整して再播種した。その後 12 時間後に付着している細胞数を測定した。

独立した3回の実験結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。対照である mock（発現ベクターのみ）の細胞数を基準（=1）とした比を算出した。

* : $p < 0.05$, ANOVA および Scheffe's test

図 9. TGF- β -Smad2 シグナルによる integrin の発現と機能

Integrin α 2 ; Collagen と結合して、細胞を接着させ組織修復に関与

Integrin α 5 ; Fibronectin と結合して、TGF- β II 型受容体の発現を誘導


Integrin β 4 ; Laminin 5 と結合して、ヘミデスモゾーム結合を形成し細胞接着に関


与

Integrin $\beta 6$; Fibronectin と結合して, TGF- β 1 を活性化

TGF- β -Smad2 シグナルによって, integrin の発現が増加する。Integrin $\alpha 2$ と integrin $\beta 4$ の発現増加によって細胞接着を亢進させる経路のみならず, integrin $\alpha 2$ と integrin $\beta 6$ の発現を増加することで TGF- β シグナルを活性化させる経路により, 協調してさらに細胞接着を亢進させる可能性がある。すなわち, TGF- β -Smad2 シグナルは, 歯周組織再生にとって理想的なシグナル伝達といえる。

|| 結合関係

 今回の研究で示した結果

 文献上で in vitro あるいは in vivo で示されている結果


 臨床現象への考察

表 1. リアルタイム RT-PCR 法で用いたプライマー

標的遺伝子	プライマーの塩基配列	増幅産物 (bp)
<i>GAPDH</i>	F:5' -GAGTCAACGGATTTGGTCGT- 3' R:5' -GACAAGCTTCCCGTTCTCAG- 3'	185
<i>SMAD2</i>	F:5' -GGGAAGTTTTTGCTGAGTGC- 3' R:5' -CCAGAAGAGCAGCAAATTCC- 3'	156
<i>SMAD3</i>	F:5' -CTGTGTGAGTTCGCCTTCAA- 3' R:5' -TGCGGGGAAGTTAGTGTTTT- 3'	183
<i>PCNA</i>	F:5' -GAAGCACCAAACCAGGAGAA- 3' R:5' -TCACTCCGTCTTTTGCACAG- 3'	193
<i>INTEGRIN α2</i>	F:5' -GGGCATTGAAAACACTCGAT- 3' R:5' -TCGGATCCCAAGATTTTCTG- 3'	183
<i>INTEGRIN α3</i>	F:5' -GCCTGCCAAGCTAATGAGAC- 3' R:5' -CACCAGCAGAGTGAGGATCA- 3'	192
<i>INTEGRIN α5</i>	F:5' -AGCCTCAGAAGGAGGAGGAC- 3' R:5' -GGTTAATGGGGTGATTGGTG- 3'	186
<i>INTEGRIN β4</i>	F:5' -TGGAAGTACTGTGCCTGCTG- 3' R:5' -TGCATGTTGTTGGTGACCTT- 3'	200
<i>INTEGRIN β6</i>	F:5' -CTCTTTCCAGTGTGGGGTGT- 3' R:5' -CTGGCAATAAGGCCCATAAA- 3'	199
<i>FIBRONECTIN 1</i>	F:5' -TGTTTCGTGCAGCTGTTTACC- 3' R:5' -GCCACCGTAAGTCTGGGTTA- 3'	196
<i>TENASCIN C</i>	F:5' -GGTACAGTGGGACAGCAGGT- 3' R:5' -GTTAACGCCCTGACTGTGGT- 3'	191
<i>VERSICAN</i>	F:5' -GGGAACCTGGTGAAGAAACA- 3' R:5' -CTTCCACAGTGGGTGGTCTT- 3'	180
<i>LAMININ α1</i>	F:5' -AGCGGATATGCAGCTCTTGT- 3' R:5' -GTTATCCTGCCAGCACCATT- 3'	191
<i>LAMININ γ2</i>	F:5' -GTCACTGGAGAACGCTGTGA- 3' R:5' -AGACCCATTTTCGTTGGACAG- 3'	198

プライマー塩基配列および増幅産物を表に示す。F, Forward ; R, Reverse

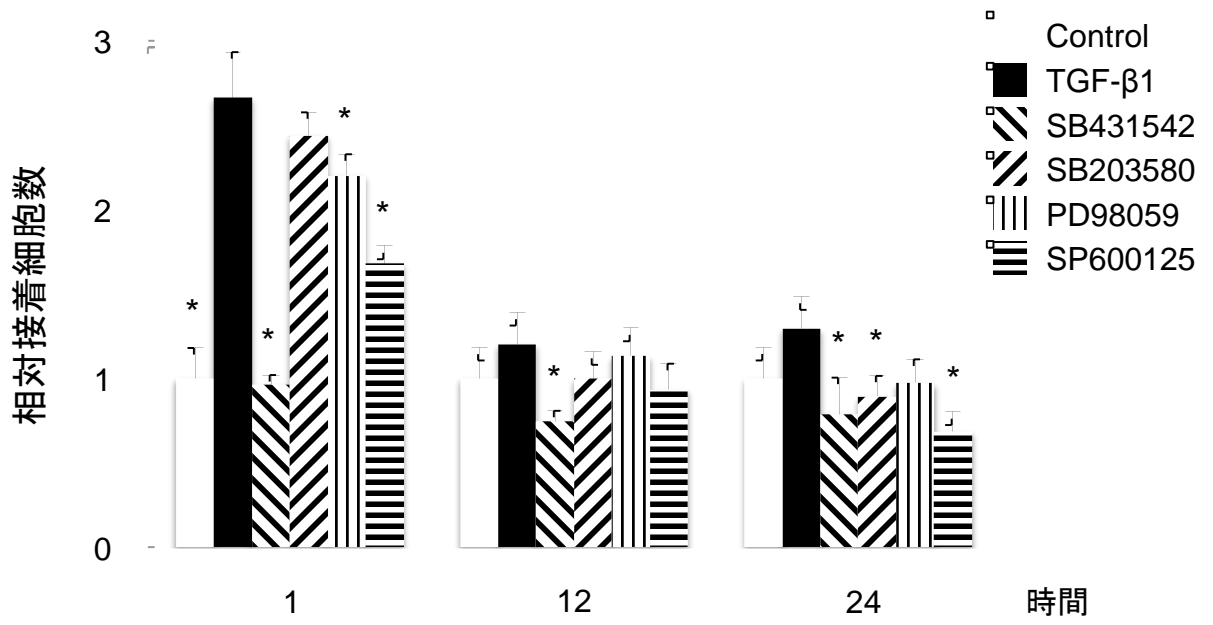
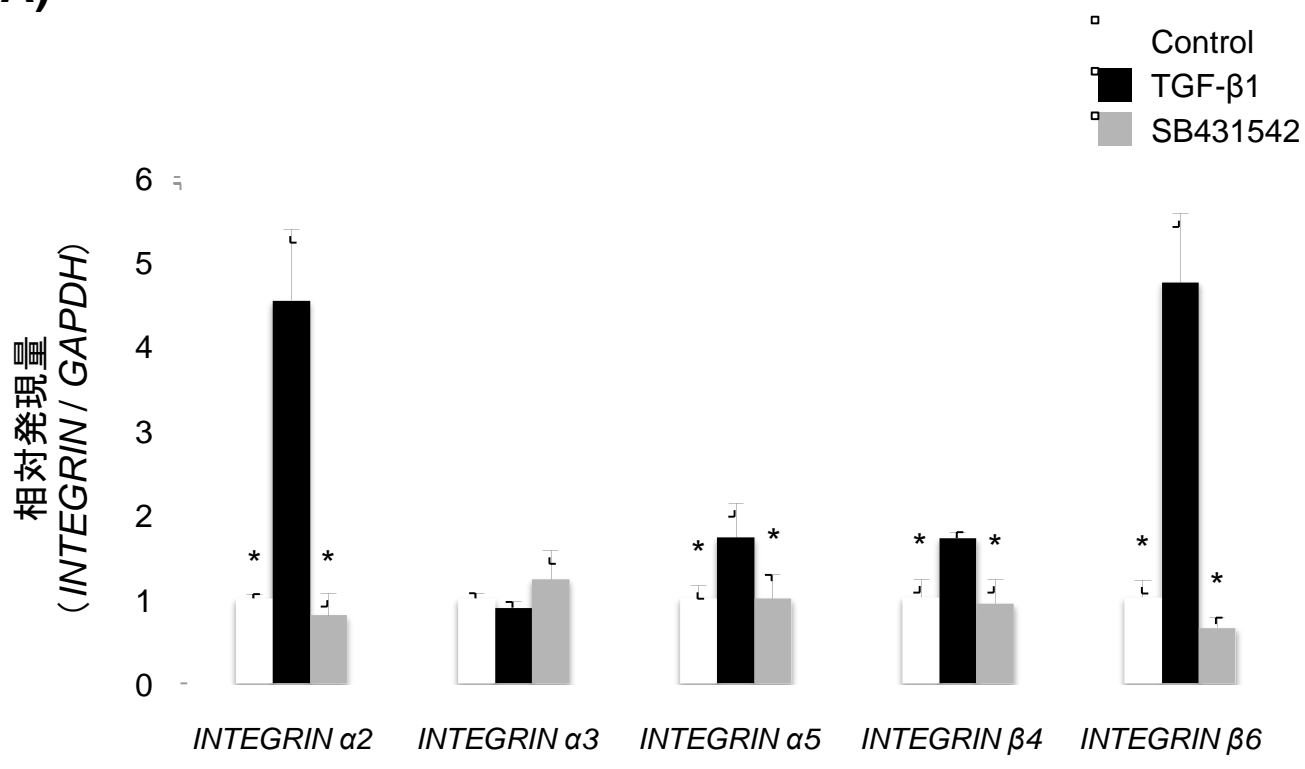


図1
本郷昌一

(A)



(B)

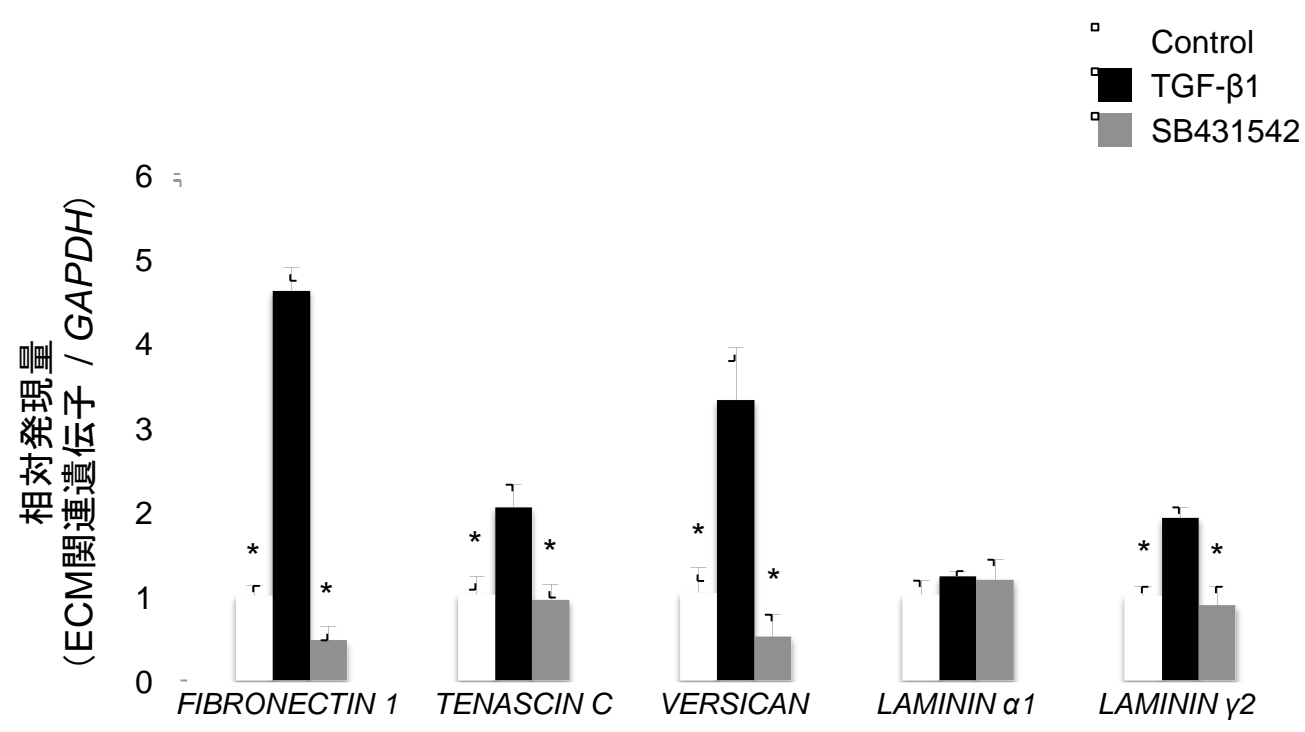
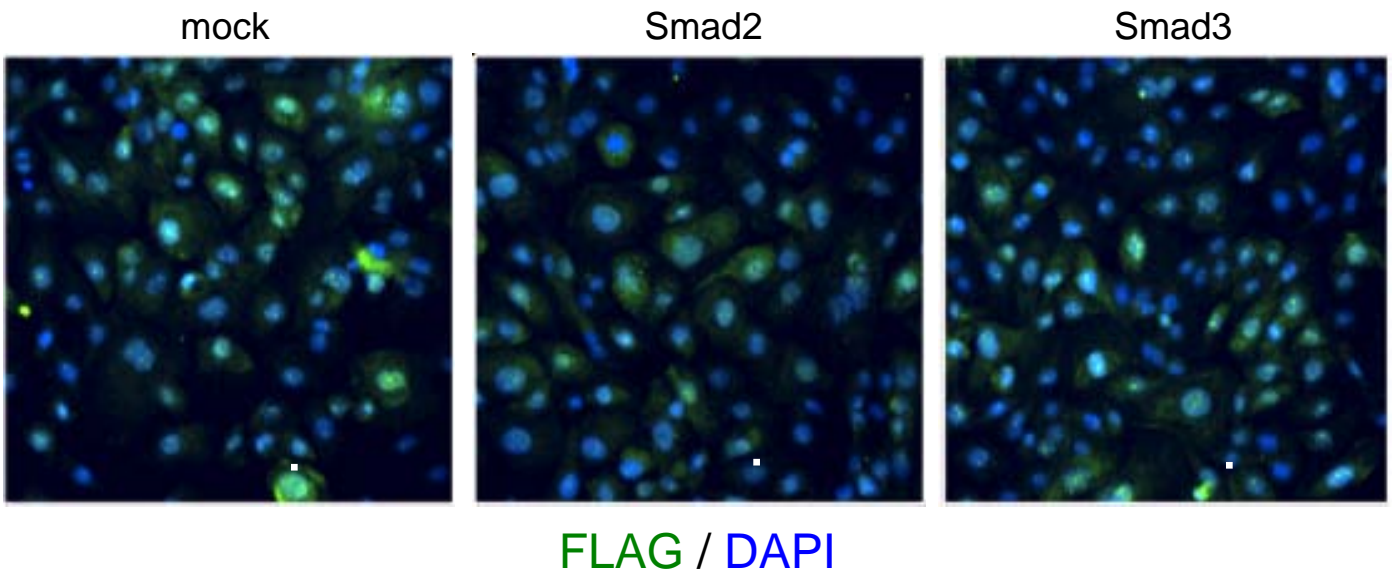
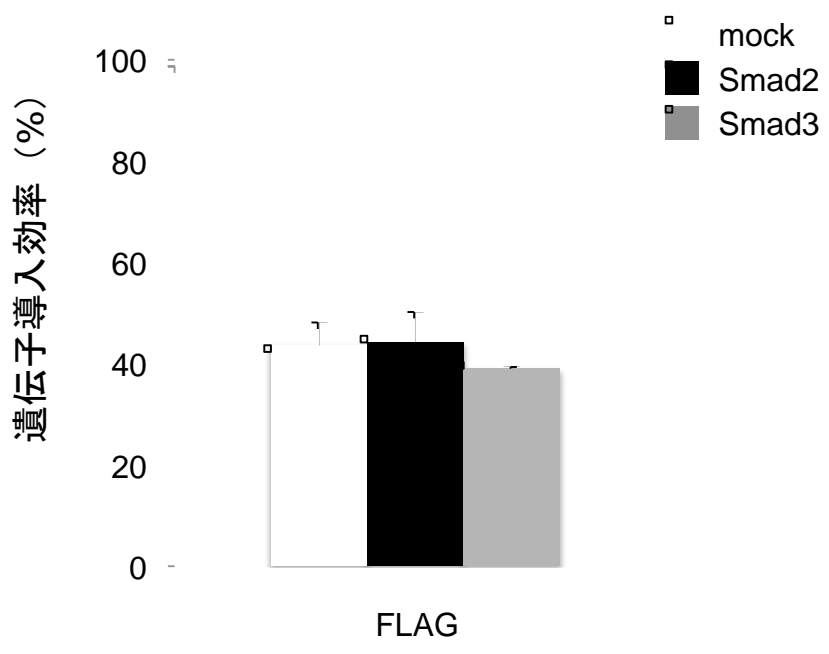


図2
本郷昌一

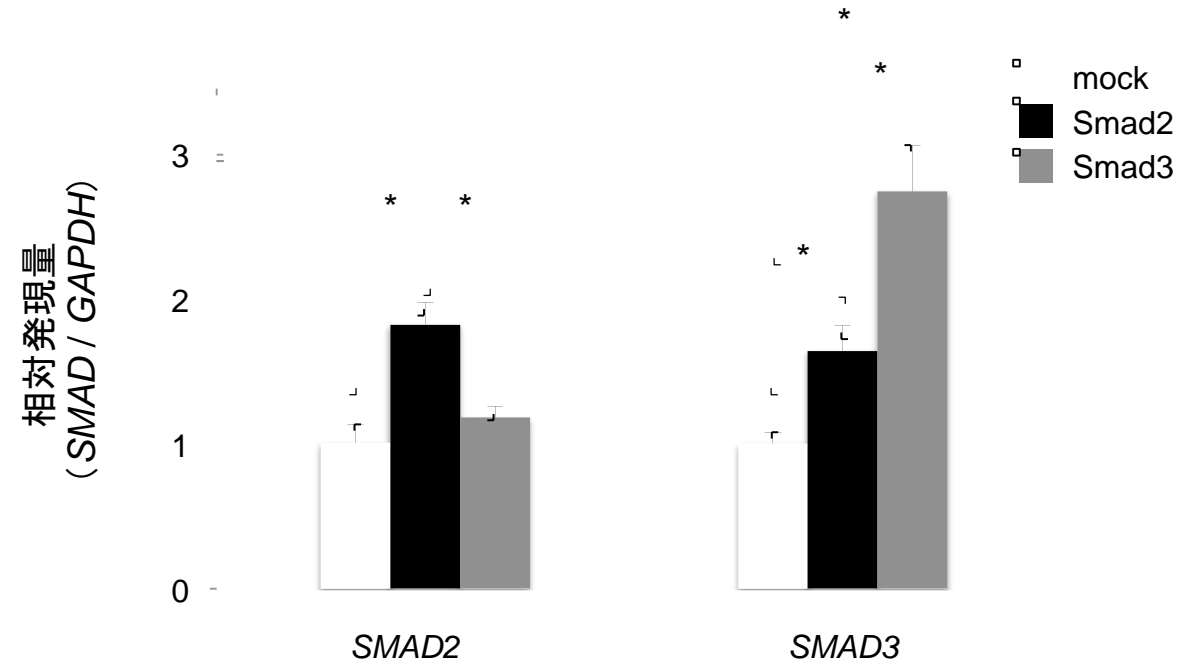
(A)



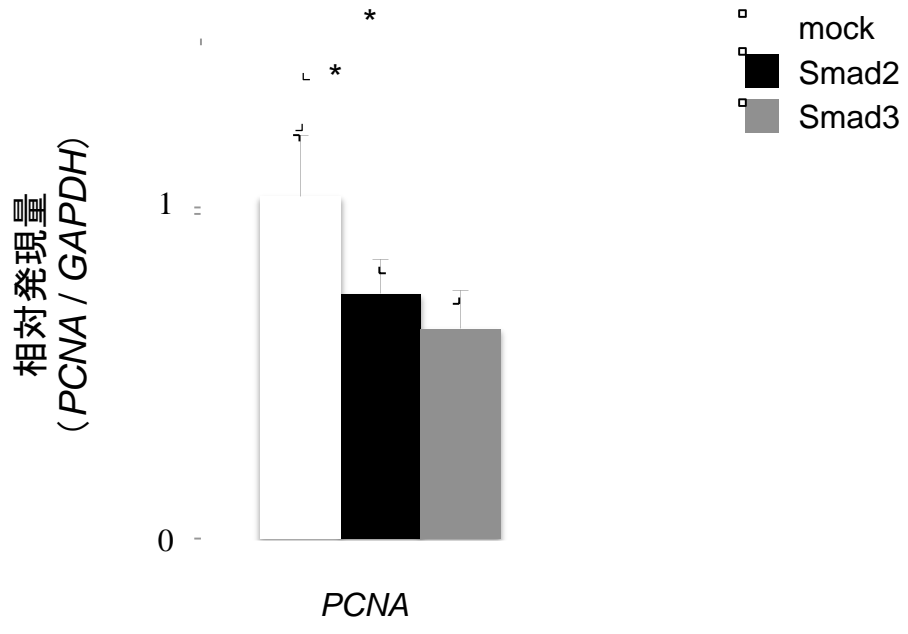
(B)



(A)



(B)



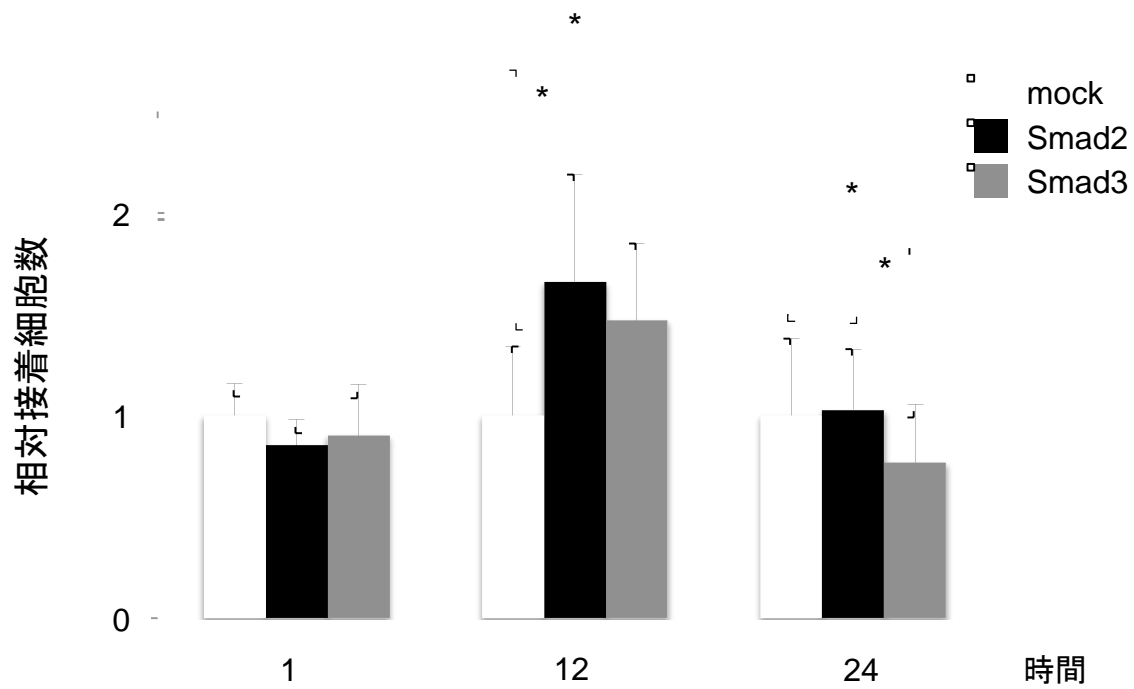
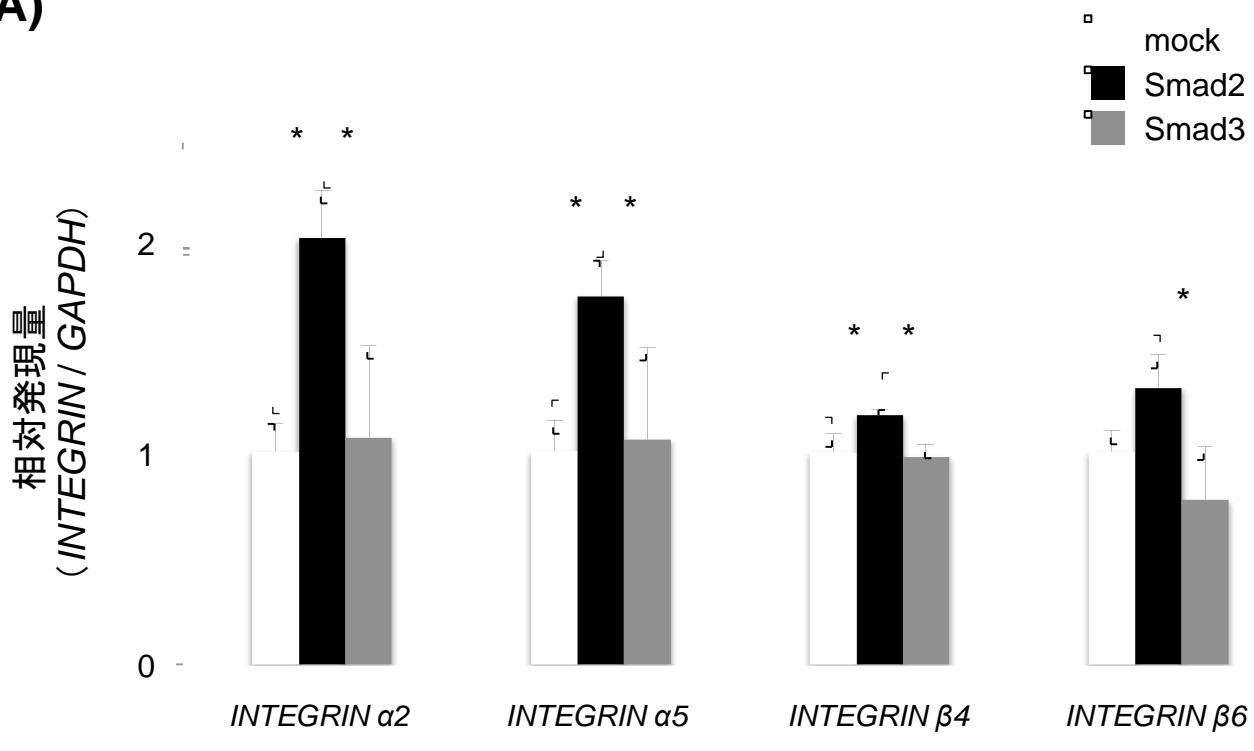


図5
本郷昌一

(A)



(B)

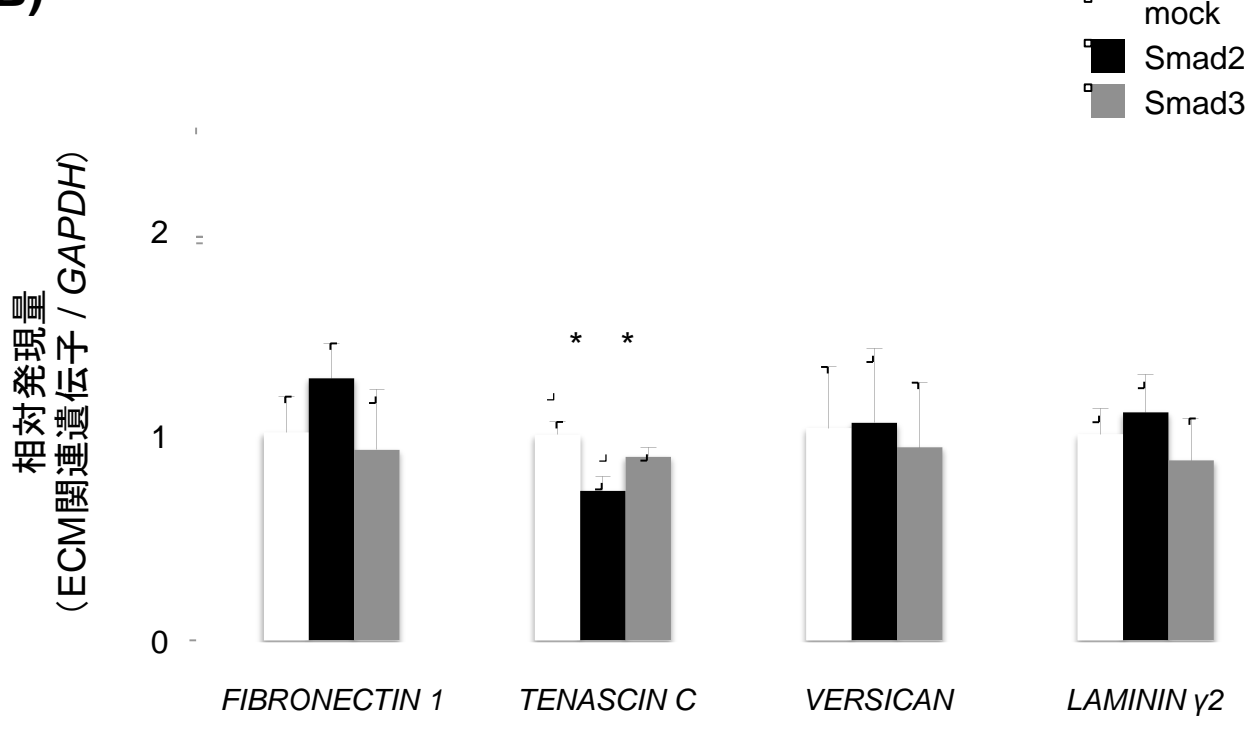


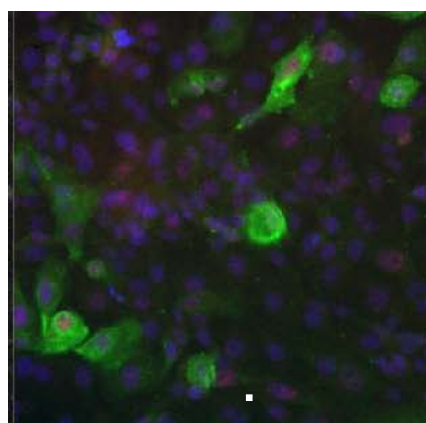
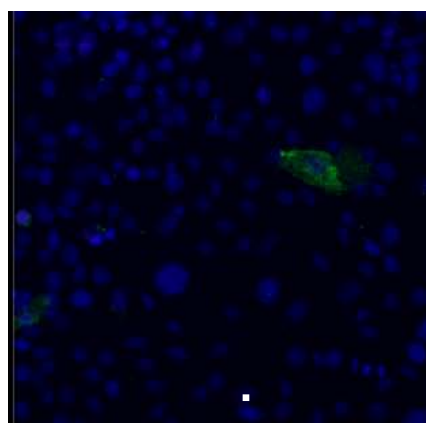
図6
本郷昌一

(A)

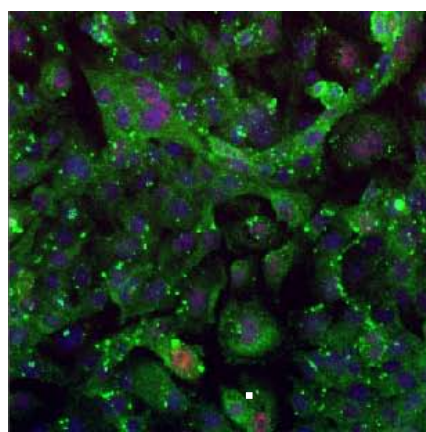
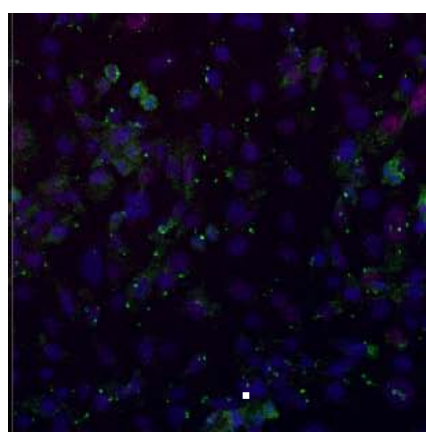
mock

Smad2

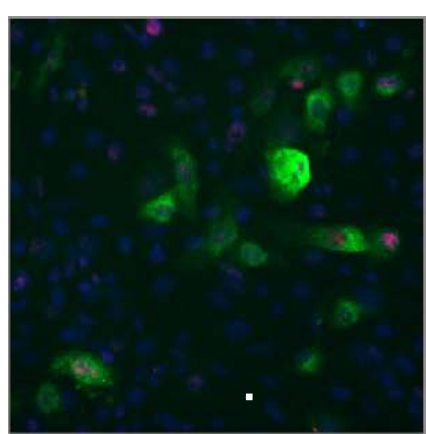
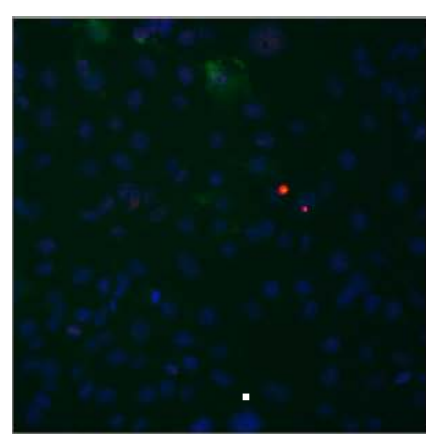
INTEGRIN α 2



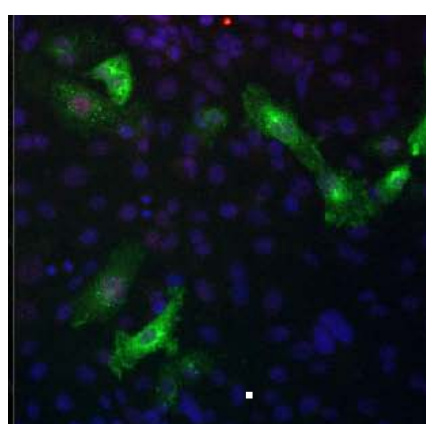
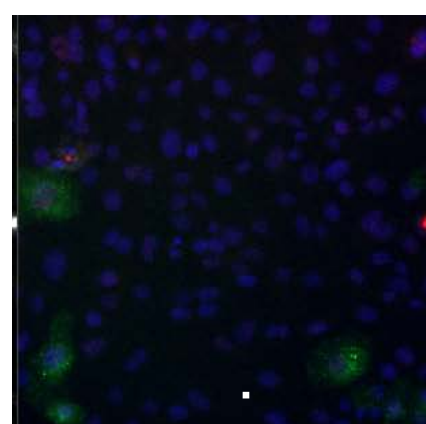
INTEGRIN α 5



INTEGRIN β 4



INTEGRIN β 6



INTEGRIN
P-SMAD2
DAPI

図7
本郷昌一

(B)

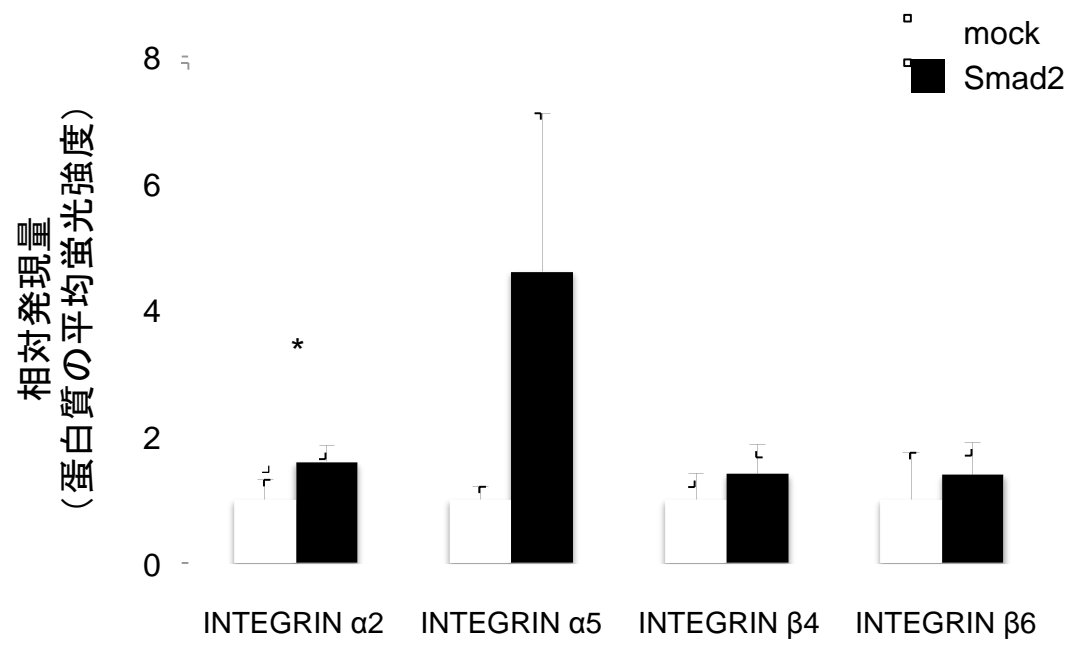
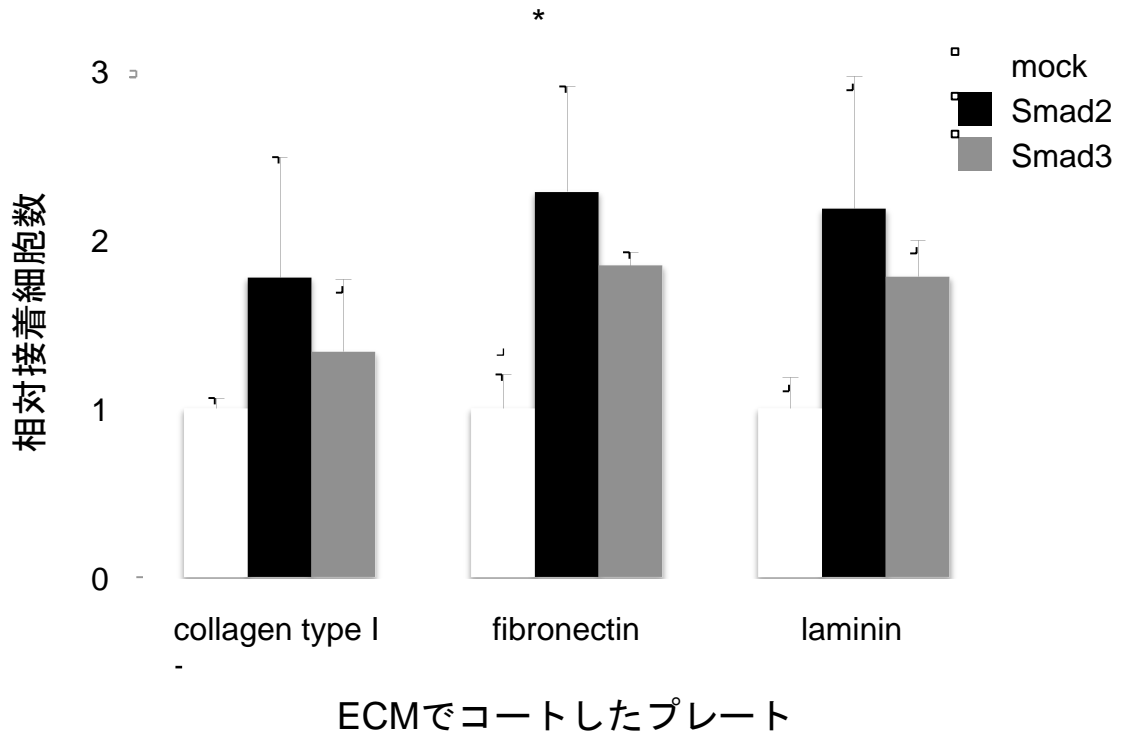


図7
本郷昌一



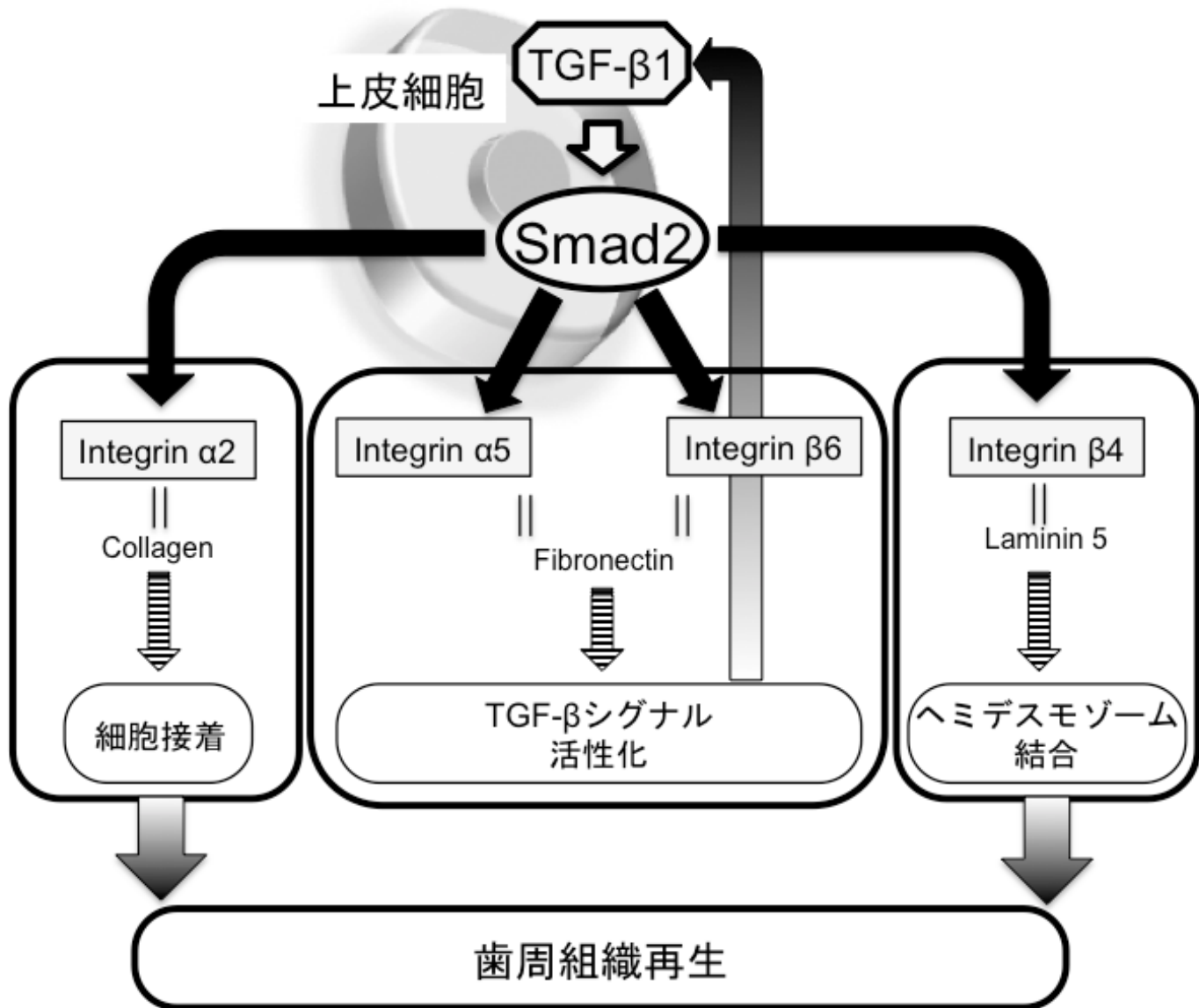


図9
本郷昌一