

氏名	高知 信介
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4922号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> による歯肉上皮細胞の細胞接着変化に関する研究
学位論文審査委員	大原 直也 教授 高柴 正悟 教授 岸本 悦央 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯肉上皮は、細胞間および歯面と接着することによって、歯周病原細菌の組織内の侵入に対するバリアーの一つとして機能している。その細胞間に存在する integrin は、 α 鎖と β 鎖の2つのサブユニットからなるヘテロダイマーであり、ヘミデスモゾーム結合を構成する重要な細胞接着因子である。また integrin は、細胞外基質 (ECM) と特異的に結合することによって組織間の接着を強固にしている。歯周病によって上皮の組織破壊が起こる際の細胞間接着の変化に関してはこれまで幾つか研究報告があるものの、歯周病原細菌感染時の炎症および接着に関連する因子の発現を制御する機序には未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、培養ヒト歯肉上皮細胞と歯周病発症の初期に関わるとされる通性嫌気性の歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 (AaY4) を共培養した時および菌を除去した時に起こる、歯肉上皮細胞の細胞接着の変化について検討した。

【材料と方法】

1. 歯肉上皮細胞の分離: 健康な歯周組織を有するドナーから歯肉を採取し、ヒト歯肉上皮細胞を分離、培養した。simian virus 40 を用いて3継代後のヒト歯肉上皮細胞を形質転換し、不死化上皮細胞株 (IHGE cells) を樹立後、継代培養を行った。
2. IHGE cells と AaY4 の共培養: IHGE cells を培養皿に播種して、抗菌薬を含まない培地で培養した。コンフルエントになった時に、以下の3条件で IHGE cells と AaY4 を共培養した。
 - i) multiplicity of infection (MOI) が 10 および 100 の濃度で AaY4 を播種後、24 時間共培養した。
 - ii) MOI が 10 で AaY4 を播種して 12 時間共培養した後に、細胞をリン酸緩衝液で洗浄して細胞外の AaY4 を除去した。さらに、細胞表層に存在する AaY4 を除去するために抗菌薬を含んだ培地に交

換し、もう 12 時間培養した。

iii) INTEGRIN $\alpha 5$ の FIBRONECTIN への結合を阻害する抗体である BIIG2 (Developmental Studies Hybridoma Bank) を、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で細胞に 1 時間作用させた後に、MOI が 10 で AaY4 を播種して 24 時間培養した。

3. 細胞接着能の検討：上記条件で培養した細胞を trypsin-EDTA で剥離し、 3.2×10^4 個/ cm^2 で培地中に再播種した。24 時間後に培養皿に付着している細胞を 4',6-diamidino-2-phenylindole にて染色後、Cellomics ArrayScan VTI (Thermo Fischer) を用いて、細胞数を測定した。
4. 遺伝子発現の定量：上記条件で培養した細胞の全 RNA を回収し、サイトカイン、増殖因子、インテグリンおよび ECM 関連遺伝子の発現量を real-time RT-PCR 法で定量した。

【結果】

1. IHGE cells と AaY4 を共培養すると、培養皿への接着能は有意に低下した。また、*PROLIFERATION CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA)*、*INTEGRIN $\alpha 2$* 、 *$\alpha 3$* 、 *$\beta 4$* 、 *$\beta 6$* と ECM の発現は減少し、*INTERLEUKIN-8 (IL-8)* と *INTEGRIN $\alpha 5$* の発現は増加した。
2. IHGE cells と AaY4 の共培養後に菌を除去すると、共培養によって増加した *IL-8* と *INTEGRIN $\alpha 5$* の発現は減少した。*PCNA* はその逆の発現変化をした。一方、*INTEGRIN $\alpha 2$* 、 *$\alpha 3$* 、 *$\beta 4$* 、 *$\beta 6$* および ECM の発現は、共培養によって減少し、共培養後に菌を除去しても変化しなかった。
3. INTEGRIN $\alpha 5$ の機能を阻害することで、IHGE cells と AaY4 を共培養による接着能の低下、および、*INTEGRIN $\alpha 2$* 、 *$\alpha 3$* 、 *$\beta 6$* の発現の減少は抑制された。*IL-8* と *PCNA* は INTEGRIN $\alpha 5$ 阻害の影響を受けなかった。

【考察とまとめ】

IHGE cells と AaY4 の共培養により、抗原認識によるサイトカインの産生、細胞増殖能の低下によるターンオーバーの抑制、および細胞の接着に関連する因子の発現減少による細胞接着能の低下が起こった。またこの接着能の低下は、INTEGRIN $\alpha 5$ のシグナル伝達を介した INTEGRIN と ECM の発現制御によるものであることが示唆された。

学位論文審査結果の要旨

歯肉上皮は、細胞同士で、および歯面と接着することによって、歯周病原細菌の組織内への侵入に対するバリアーのひとつとして機能している。その細胞間に存在する接着分子である integrin は、 α 鎖と β 鎖の2つのサブユニットからなるヘテロダイマーであり、ヘミデスモゾーム結合を構成する重要な細胞接着因子である。また integrin は、細胞外基質 (Extracellular matrix ; ECM) と特異的に結合することによって組織間の接着を強固にしている。歯周病によって上皮の組織破壊が起こる際の細胞間接着の変化に関しては、これまでに幾つか研究報告があるものの、歯周病原細菌感染時の炎症および接着に関連する因子の発現を制御する機序には未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、培養ヒト歯肉上皮細胞株と、歯周病発症の初期に関わるとされる通性嫌気性の歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) を共培養した時、および共培養後に菌を除去した時に起こる、歯肉上皮細胞の細胞接着の変化について検討した。

研究結果は、以下の内容であった。

- 1) 歯肉上皮細胞株と AaY4 株の共培養によって、細胞の培養皿への接着能は有意に低下した。また、増殖関連因子である *PROLIFERATION CELL NUCLEAR ANTIGEN* (PCNA) , 接着に関連する *INTEGRIN α 2*, *α 3*, *β 4*, *β 6* と調べた ECM 遺伝子の発現は減少し、炎症性ケモカインである *INTERLEUKIN-8* (*IL-8*) と *INTEGRIN α 5* の発現は増加した。
- 2) 共培養後に菌を除去すると、共培養によって増加した *IL-8* と *INTEGRIN α 5* の発現は減少した。*PCNA* は逆に発現が増加した。*INTEGRIN α 2*, *α 3*, *β 4*, *β 6* および *FIBRONECTIN 1*, *TENASCIN C* の発現は、共培養によって減少したが、共培養後に菌を除去してもその後の変化は認められなかった。
- 3) ECM との結合を阻害する *INTEGRIN α 5* の抗体を使用することで、共培養による接着能の低下、および、*INTEGRIN α 2*, *α 3*, *β 6* の発現の減少は抑制された。*IL-8* と *PCNA* の発現は抗体による *INTEGRIN α 5* の機能阻害の影響を受けなかった。

以上のことから、本論文では、歯肉上皮細胞株と AaY4 の共培養時において、*INTEGRIN α 5* はシグナルを伝達することで、他の integrin の発現を制御している可能性が示された。これらの結果は、歯周炎発症や治癒のメカニズムを解明する上で、歯周病原細菌が歯面と上皮の接着に及ぼす影響を考慮することはきわめて重要である。

よって、審査委員は一致して、本論文に博士（歯学）の学位論文として価値を認めた。