

インテグリンサブユニットが歯根膜線維芽細胞の遊走に及ぼす影響

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

河村 麻理

Effects of Integrin Isoforms on Migration of Periodontal Ligament Fibroblasts.

Department of Pathophysiology-Periodontal Science,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Mari KAWAMURA

(平成 28 年 12 月 15 日受付)

緒言

歯周病は歯周病原細菌を含む口腔常在細菌による内因性感染症である。口腔内の清掃不良と、加齢や種々の全身疾患による生体防御機能の低下は、歯周組織の恒常性の破綻を起こす。すなわち、口腔細菌叢の変化、さらに歯肉溝部での細菌定着とバイオフィルム形成の増加に対する免疫反応と炎症が遷延化することによって、歯周組織破壊が生じる¹⁾。したがって、感染源であるバイオフィルムを除去し、口腔細菌叢の恒常性を保つことが歯周治療において必要不可欠である。

現在、日常臨床で行われているスケーリング・ルートプレーニングや歯周外科治療などの機械的な方法によって感染源を除去すると、組織損傷が生じ、創傷治癒が起こる。創傷治癒は炎症、新組織形成、そしてリモデリングの三段階から成り立っている²⁾。まず組織の損傷を発端に血液成分が血管外から滲出し、好中球やリンパ球が異物や細菌を貪食することによって炎症反応が生じて、その結果産生される transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) , さらに platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) などの成長因子が周囲組織細胞の増殖と遊走、毛細血管の新生、さらに新生コラーゲン組織の産生を促進することによって、組織の修復が行われる³⁾。その際、創傷部位への組織内の幹細胞の誘導が組織

再生には必須であり，組織幹細胞の遊走と増殖の時間および空間的な制御が治癒形態に大きく影響することが報告されている。

歯周組織は，主に歯肉上皮，歯肉結合組織，歯根膜，および歯槽骨によって構成されている。歯周組織の創傷治癒形態には，歯肉上皮細胞が主体で形成される上皮性付着，歯肉結合組織由来細胞による被包，骨芽細胞による骨性癒着，そして歯根膜由来細胞による結合組織性付着がある^{4, 5)}。これらの治癒形態は，歯槽骨欠損部の歯根面に最初に遊走してくる細胞によって決定づけられる⁶⁾。歯周組織の恒常性維持という観点から，コラーゲン線維が根面セメント質に垂直に陥入，または並行に走行することによって形成される結合組織性付着による歯周組織の再生が望ましいと考えられている⁷⁾。歯根膜は，線維芽細胞，骨芽細胞，セメント芽細胞，破骨細胞，間葉系幹細胞，さらにヘルトヴィッヒの上皮鞘に由来する上皮細胞などによって構成されており⁸⁾，*in vitro* で分離されるヘテロな線維芽細胞様細胞の集団である歯根膜線維芽細胞は未分化な間葉系幹細胞を含み，骨芽細胞，軟骨芽細胞，脂肪細胞，さらにセメント芽細胞への分化能を有する⁹⁾。さらに，*ex vivo* で歯槽骨欠損部に移植すると，新生歯槽骨，セメント質，およびシャーピー線維を再生することが報告されている^{9, 10)}。すなわち，歯周組織の恒常性維持と再生のためには，骨欠損部の歯根面への歯根膜線維芽細胞の遊走促進が非常に重要である。

近年、幹細胞をはじめとした細胞生物学的な研究において、細胞と細胞周囲の微小環境との相互作用が、細胞遊走を含む全ての細胞挙動の制御に重要¹¹⁾であることが明らかになっている¹¹⁾。すなわち、細胞周囲の成長因子による刺激と細胞外基質 (extracellular matrix : ECM) との接着によるバイオケミカルおよびメカニカルな微小環境の変化は、細胞表面のレセプターや接着分子インテグリンを介して、様々な細胞内シグナルの活性化と遺伝子発現変化を誘導する。この細胞内変化は、微小環境の分布や活性化を修飾する多様な因子の産生に関与するのみならず、選択的なインテグリンの活性化と ECM への結合を調節することによって、細胞分裂や、分化、遊走、細胞死などの細胞表現型の変化を引き起こし、組織形成や恒常性維持、および再生に関与する¹²⁾。

インテグリンにはリガンド特異性を決定づける 18 種の α 鎖とインテグリンの活性化を制御する 8 種の β 鎖のヘテロダイマーからなる 24 種のサブユニットが存在する¹³⁾。そのリガンドはインテグリンによって特異性があり、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸配列 (RGD 配列) を特異的に認識する integrin $\alpha 5 \beta 1$ など、徐々にその結合部位の解明が進んでいる¹⁴⁾。このインテグリンを介した細胞-ECM 結合は細胞遊走のメカニズムを解明する上で重要であり、さらに、インテグリンと細胞内で結合しているアクチン細胞骨格が細胞内の動的なプロセスの中心的役割を

担うオルガネラとして存在する。アクチン細胞骨格は Rho ファミリー低分子 G タンパク質により重合と脱重合の調整を受け、細胞伸縮の動力が制御される。そして、インテグリンがその動力を ECM と連結することによって細胞遊走の進行方向が決定されることが明らかとなっている¹³⁾。

インテグリンを介した歯根膜線維芽細胞と ECM との相互作用について様々な研究が進められている。特に integrin $\alpha 5 \beta 1$ は、フィブロネクチンを介してセメント質に接着する¹⁵⁾ことや、RGD 含有ペプチドを介して歯根膜線維芽細胞と接着する¹⁴⁾報告があり、integrin $\alpha 5 \beta 1$ の歯周組織における機能が明らかになりつつある。一方、これまで歯根膜線維芽細胞の遊走を制御する微小環境の研究には成長因子による制御に焦点が当てたものが多く^{16,17)}、PDGF-BB¹⁸⁾や FGF-2¹⁹⁾など成長因子の臨床応用が始まりつつある。今後は、再生した組織の恒常性の維持を目指すことが重要となる¹²⁾。しかし、細胞の恒常性の維持に重要なインテグリンの活性化と ECM への結合調節による歯根膜線維芽細胞の遊走制御に関する研究はない。細胞の遊走過程において、多様なインテグリンサブユニットの発現量と局在が時間および空間的に制御を受けていると考えられる。すなわち、インテグリン発現の選択的制御は、歯周組織の再生に重要な歯根膜線維芽細胞の遊走促進に繋がる可能性があると考ええる。

以上のことから、本研究では、歯根膜線維芽細胞が遊走時に発現するインテグリンを解明し、さらにそのインテグリンの発現制御が遊走能に与える影響を解明することを目的とした。そこで、遊走効果が最も高い細胞遊走刺激因子の同定と、細胞遊走因子による刺激時に発現する ECM とインテグリンの同定を行い、さらにインテグリンの機能阻害による遊走能の変化について調べた。

材料と方法

1. 試薬

細胞遊走刺激因子として、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)²⁰⁾, fibroblast growth factor-2 (FGF-2)²¹⁾, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)²²⁾ (以上, Miltenyi Biotec ; Bergisch Gladbach, Germany), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)²³⁾ (R&D System ; Minneapolis, MN, USA), および platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)¹⁸⁾ (PEPROTECH ; Rocky Hill, NJ, USA) を用いた。また、細胞増殖阻害剤として、細胞内で還元された核酸塩基分子に結合して DNA の開裂を阻止し、その複製を阻害する mitomycin C (MC : ナカライテスク, 京都) を用いた。

2. 歯根膜線維芽細胞の分離・培養

本人または保護者へのインフォームド・コンセントの下，健康な歯周組織を有する3名のドナー（20歳女性，19歳女性，15歳男性）の第一または第二小臼歯，智歯を矯正治療のために便宜抜歯を行い，それらに付着する歯根膜組織を採取した（岡山大学研究倫理審査専門委員会：承認番号2070）。ドナーには，細胞の提供を受ける前に，使用目的を十分に説明して同意を得た。線維芽細胞様細胞である歯根膜線維芽細胞は Seo らの方法⁹⁾に従い分離した。すなわち，歯根中央部から採取した歯根膜組織を2 mg/mL の Collagenase Type I(フナコシ株式会社，東京)と1 mg/mL の DISPASE[®] II (三光純薬株式会社，千葉)を体積比1:1で混合した溶液にて37℃で60分間処理を行った。さらに，同溶液からメッシュサイズが70 μm の Cell strainer (Corning, Corning, NY, USA) を用いて組織片等の凝集塊を除去した後に，遠心分離(270 × g, 5分間)し，沈殿を100 mm Dishes (Corning #430167) に播種した。培地には20% fetal bovine serum (FBS : Biowest SAS, Nuaille, France) , 1% Penicillin-Streptomycin Antibiotic Mixture (PS : Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) , そして1% L -Glutamine (Thermo Fisher Scientific) を含有する Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α-MEM : Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用い，37℃, 5% CO₂, 100% 湿度下で細胞培養を21日間行って，コロニーの形成を確認した。上記で得たコロニーを継代し，以後の実験系に用いた。実

験には2～5継代した細胞を用いた。

歯肉由来細胞として、Ca9-22細胞（歯肉上皮がん細胞；国立研究開発法人 医療基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク，大阪）を4～8継代したものを使用した。培地には10% FBS と1% PS（Thermo Fisher Scientific）を含有する Dulbecco's Modified Eagle Medium（D-MEM：Thermo Fisher Scientific）を用い、37℃、5% CO₂、100% 湿度下で細胞培養した。ともに細胞の継代には、最終濃度が0.05% Trypsin と0.5 mM ethylenediaminetetra-acetic acid（EDTA）（共に Thermo Fisher Scientific）になるように調整された混合溶液（Trypsin-EDTA）を用いた。

以後の全ての実験系において、歯根膜線維芽細胞と Ca9-22 細胞は血清飢餓状態（0.1%）で24時間培養することによって細胞周期を同調させた²⁴。そして、それぞれの細胞を 3.75×10^4 cells/cm² で培養皿に再播種し、9時間経過時に培養皿への細胞接着を確認した後に、1 μg/mL MC を培地に添加してさらに1時間培養することによって細胞増殖を阻害したしたものを使用した（図1）。なお、各種遊走刺激因子による細胞遊走面積の定量解析（図2）は、MC 無添加の条件で行った。

3.細胞活性試験

各種刺激因子による歯根膜線維芽細胞の細胞障害性を、CellTiter 96[®] AQueous Assay（Promega, Madison, WI, USA）を用いて、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-

carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) 法によって調べた。

すなわち、96-well マルチプレート (Corning, Corning, NY, USA) で上記 2. の記載にしたがって培養した歯根膜線維芽細胞を各種刺激因子で刺激し、38 時間後に MTS を最終濃度 0.5 mg/mL になるように添加して、2 時間後に生成されたホルマザン色素の吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000 Lab : コロナ電気株式会社, 茨城) を用いて 490 nm の波長で測定した。

4. 細胞遊走試験

細胞遊走試験は、各 well の中央部にシリコン樹脂製ストッパーがセットされた 96-well マルチプレートである Oris Cell Migration Assay Kit (Platypus Technologies, Madison, WI, USA) を用いて、添付の使用説明書にしたがって行った (図 1)。

すなわち、上記 2. の記載にしたがって、ストッパーがセットされたプレートで培養した歯根膜線維芽細胞を、上述の各種細胞遊走刺激因子で刺激し、ストッパーを除去することによって細胞遊走を促した。刺激 38 時間後に全細胞を 0.1 μ M の CorningTM Calcein AM Fluorescent Dye (Thermo Fisher Scientific) によって染色し、ストッパーにて確保されていた検出域に遊走した細胞を撮影した。染色像はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700 : KEYENCE, 大阪) にて記録 (倍率 : 4 倍, 露光時間 : 1/1.2 秒) し、Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) によって処理

して細胞遊走面積を定量解析した。また，細胞遊走時にアクチンの重合を制御するシグナルである RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1 (Rac 1)²⁵⁾を阻害するために，NSC23766 (Sigma-Aldrich) を用いた。細胞播種時に NSC23766 を 10 μ M 添加した後は，上述の方法にしたがって細胞遊走面積を定量解析した。

5. タイムラプス撮影

細胞遊走刺激時の，歯根膜線維芽細胞の遊走運動をタイムラプス撮影にて観察した。タイムラプス撮影は，Cellomics Array Scan VTI (Thermo Fisher Scientific) を用いて使用説明書にしたがって行った。すなわち，上記 4. の記載にしたがって培養した歯根膜線維芽細胞を細胞遊走刺激因子で刺激し，検出域に遊走した細胞を明視野で 10 frame / sec の間隔で 38 時間後まで連続撮影した。また，撮影後に撮影画像を用いて遊走開始時間を算出した。

6. 細胞接着因子と ECM に関連する遺伝子発現解析

細胞接着因子と ECM の遺伝子発現量は，リアルタイム RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 法を基本とし，84 種類の細胞接着因子と ECM を検出する Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules PCR Array (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて，付属の使用説明書にしたがって定量解析を行った。

6-well マルチプレート (Corning, #3596) で、上記 2 の記載にしたがって培養した歯根膜線維芽細胞を細胞遊走刺激因子で刺激し、8 時間後 (前述のタイムラプス撮影にて細胞遊走を開始する時間) に細胞を回収し、以下の処理を行った。

- 1) 全 RNA の抽出: 全 RNA は、シリカ膜への吸着を利用した RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて上記細胞から抽出した。なお RNA 抽出過程で gDNA Eliminator スピんカラム (QIAGEN) を使用して混入した DNA を除去した。RNA の濃度と純度は、Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 260 nm と 280 nm 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 1.8~2.2 の間であることを確認した。
- 2) 逆転写反応: 抽出した RNA 1 μ g をテンプレートとして、RT² First Strand Kit (QIAGEN) を用いて、42 °C で 15 分間の逆転写反応を行って、cDNA を合成した。その後、95 °C、5 分間の加熱で逆転写酵素を不活化した。
- 3) リアルタイム RT-PCR 法: PCR 反応は、cDNA 合成反応液と 2 × RT² SYBR Green MasterMix、および RNase-free Water と混合し、95 °C で 10 分間の 2 本鎖 DNA の変性後、95 °C で 15 秒の熱変性、60 °C で 1 分のアニーリングと伸長反応のステップを 40 サイクル行った。この反応は 7300 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、その際の PCR 産物が発する蛍光量

を SDS v1.X with RQ software (Thermo Fisher Scientific) にて測定した。PCR Array

Data Analysis Web Portal-version 3.5

(<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) にて解析を行い、

精度が高いと判断された遺伝子の相対発現量を示した。

7. 各種 integrin と ECM の遺伝子発現解析

前述の 6 の結果より、遺伝子発現量の増加がみられた *integrin α2, α3, α4, α5, β1* と、これらのリガンドである *collagen type I α1*, さらに *fibronectin 1* の遺伝子発現量を、前述 6 と同条件で培養した歯根膜線維芽細胞から抽出した全 RNA を用いたリアルタイム RT-PCR 解析を行った。

1) 逆転写反応: 抽出した RNA 1 μg をテンプレートとして、50 μM oligo (dT) 12-18

Primer (Thermo Fisher Scientific) と 10 mM dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific)

を 1 : 1 で混合した 13 μL の溶液を、65 °C で 5 分間熱処理して、RNA のステ

ム構造を破壊した後に氷上で 1 分間急冷反応させて Primer をアニールした。そ

して、5 × First Standard Buffer, 0.1 M dithiothreitol, SuperScript III Reverse

Transcription (全て Thermo Fisher Scientific), および RNase-free Water (QIAGEN)

を 4 : 1 : 1 : 1 で混合した 20 μL の溶液にて、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 分間の加熱で逆転写酵素を不活化

した。

- 2) リアルタイム RT-PCR 法：PCR 反応は、cDNA 合成反応液を 10 倍希釈した溶液を、上記で作成したとセンスならびにアンチセンス PCR プライマー (10 μ M), 2 \times Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), および RNase-free Water と混合し、前述 6 と同条件で増幅反応を行った。なお, *integrin α 2, α 3, α 4, α 5, β 1, collagen type I α 1*, そして *fibronectin 1* の mRNA 発現量は *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh)* の mRNA 量を内部対照として、比較 Ct 法にて定量し、相対発現量として示した。なお, *Integrin α 2, α 3, α 4, α 5, β 1*, さらに *collagen type I α 1, fibronectin 1*, そして *gapdh* のプライマーは Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) を用いて、増幅サイズ 150~200 bp, プライマーサイズ 20 塩基, GC 含有量 45~55 %, Tm 値 57~58 $^{\circ}$ C の条件で設計して(表 1)合成し、理論上の特異的な増幅を NCBI primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて確認した。

8. 免疫蛍光染色

歯根膜線維芽細胞が細胞遊走因子刺激時に発現するインテグリンの細胞内局在は、免疫蛍光染色法を用いて検出した。免疫蛍光染色法は、特異的一次抗体と蛍光色素標識の二次抗体を反応させ、励起光を照射することによって検出した。すなわ

ち、培養細胞は、8-well チャンバースライド (Falcon® 8-well culture Slide, #354108 : Thermo Fisher Scientific) 上に播種し、3.7%パラホルムアルデヒド (pH7.4 ; 和光工業, 広島) に 10 分間浸漬固定した後, polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20 ; 和光工業) 添加リン酸緩衝液 (PBST, pH 6.8) で 3 回浸漬洗浄した。試料は、10 % Non-Immune Goat Serum (Thermo Fisher Scientific) にて 30 分間室温下にてブロッキング後、一次抗体として抗 integrin $\alpha 3$ マウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) と抗 integrin $\alpha 5$ ラビットモノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, UK), 抗 Golgi ラビットモノクローナル抗体 (MBL ライフサイエンス株式会社, 名古屋), 抗 vitronectin ラビットモノクローナル抗体 (Proteintech Group, Rosemont, IL, USA), あるいは抗 integrin $\alpha 5$ ラビットモノクローナル抗体と抗 fibronectin マウスモノクローナル抗体 (Abcam) を PBS にて 1 : 100 の濃度に希釈した溶液を用い、室温で 1 時間反応させた。次に、二次抗体である Alexa Flour® 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体および Alexa Flore® 594 ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (共に 2 mg/mL, pH 7.5; Thermo Fisher Scientific) を PBST にて 1 : 200 の濃度に希釈した後、室温で 30 分間反応させた。その後、VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて核染色および封入し、40 x 0.95 の対物レンズを使用して、405 / 442 nm, 488 / 561 nm, 543 / 630 nm にフィルターを設定した共焦点レー

レーザー走査顕微鏡 (ZEISS LSM780 ; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて局在を観察した。

9. インテグリン阻害時の細胞遊走試験

インテグリン機能を制御するために、上記 6 のアレイ解析によって同定したインテグリンの中和抗体 (抗 integrin $\alpha 3$ マウスモノクローナル抗体あるいは抗 integrin $\alpha 5$ ラビットモノクローナル抗体 ; とともに Sigma-Aldrich) を添加した。ネガティブコントロールとして、抗マウス IgG Isotype control 抗体と抗ラビット IgG isotype control 抗体 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) を用いた。

さらに、integrin $\alpha 3$ と細胞膜上で結合し、線溶系を介して細胞遊走を制御するウロキナーゼ受容体 (uPAR) にウロキナーゼ (uPA) が結合することを阻害するペプチド ($\alpha 325$; ANASPEC, Fremont, CA, USA) を使用した²⁶⁾。阻害ペプチドのコントロールには $\alpha 325$ のアミノ酸配列を並び替え、阻害作用がないことを確認されているスクランブルペプチド (Sc $\alpha 325$) を用いた。上記 2 の記載と同様に歯根膜線維芽細胞と Ca9-22 細胞を培養し、播種 10 時間後に各試薬を添加し、定量解析を行った。

10. 統計処理

各実験系における統計処理は、3 群間以上の差の検定には one-way analysis variance (one-way ANOVA) を用い、さらに多重比較検定を Tukey-Kramer test で行った。2 群間の差の検定には、Student's *t*-test を用いた。

各々の統計処理には、Stat Plus : mac LE (AnalystSoft, Walnut, CA, USA) を用いて検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

各種遊走刺激因子による細胞活性の比較と細胞遊走に効果的な遊走刺激因子

細胞遊走刺激因子の至適濃度の検討は、既報に基づいて^{18, 20-23)}、TGF- β 1, PDGF-BB, そして FGF-2 は 5-20 ng/mL, BMP-2 と SDF-1 は 50-200 ng/mL の濃度範囲で行った。TGF- β 1 と PDGF-BB は濃度依存的に吸光度が増加し、10 ng/mL 以上で細胞増殖効果があることがわかった。また、BMP-2 と SDF-1 では濃度依存的に吸光度は減少し、どちらも 200 ng/mL で細胞障害性があった。一方、FGF-2 においては 5-10 ng/mL では吸光度が増加したが、20 ng/mL では減少した。細胞増殖効果は、PDGF-BB の 10-20 ng/mL が最も高く、次いで FGF-2 の 10 ng/mL であった。以上の結果から、TGF- β 1 (10 ng/mL), BMP-2 (100 ng/mL), PDGF-BB (10 ng/mL),

FGF-2 (10 ng/mL), および SDF-1 (100 ng/mL) を今後の実験において用いた ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey-Kramer test : 図 2 A)。

上記の濃度で遊走刺激因子を作用させた結果, medium 群と比較して, TGF- β 1, BMP-2, PDGF-BB の順で遊走細胞面積は増加した。さらに, PDGF-BB 刺激群において細胞遊走面積が 2.5 倍増加した。 ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey-Kramer test : 図 2 B, 2C)。一方, FGF-2 と SDF-1 によって遊走面積は殆ど増加しなかった。したがって, 以降の実験においては, PDGF-BB (10 ng/mL) を遊走刺激因子として用いた。

さらに, PDGF-BB の制御シグナルである Rac1 を阻害した結果, PDGF-BB のみ刺激群と比較して細胞遊走面積は減少した ($p < 0.05$, Student's *t*-test : 図 3 A, 3B)。

細胞遊走の状況

まず, 細胞増殖阻害剤として使用した MC の細胞障害性を 1-5 μ g/mL の濃度範囲で検討したところ, 2.5 μ g/mL 以上で細胞障害性を示した。したがって, 今後の全ての実験では 1 μ g/mL を用いた ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey-Kramer test : 図 3C)。

細胞増殖を阻害した歯根膜線維芽細胞を PDGF-BB によって刺激し, 細胞動態についてタイムラプス撮影を行い, 遊走開始時間を算出した。撮影開始 8 時間後に medium 群と PDGF-BB 刺激群ともに検出域への細胞遊走が確認できた(図 3D: 8 h)。特に, PDGF-BB 刺激群では, 8 時間後での遊走先端の細胞 (*) に連なって他の細

胞が遊走する様子が撮影できた。38 時間後まで撮影すると、PDGF-BB 刺激群において検出域への細胞遊走が顕著に多かった (図 3D : 38 h)。

細胞遊走時に発現する ECM と細胞接着因子の遺伝子発現

タイムラプス解析で明らかになった細胞遊走開始に要する時間である PDGF-BB 刺激 8 時間後に、total RNA を回収し PCR アレイを行った。medium 群と PDGF-BB 刺激群と比較すると、*integrin $\alpha 2$* , *$\alpha 3$* , *$\alpha 4$* , さらに *$\alpha 5$* の遺伝子発現量は約 2 倍増加し、これらの発現分子と会合する分子の *integrin $\beta 1$* の発現量は変化しなかった。一方、*integrin $\alpha 2$* の代表的リガンドである *collagen type I $\alpha 1$* と、*integrin $\alpha 4$* , *$\alpha 5$* のリガンドである *fibronectin 1* は PDGF-BB で刺激を行っても遺伝子発現量には変化がなかった。また、 *$\alpha 3$* のリガンドである laminin-5 (332) を構成するサブユニットである *laminin subunit $\beta 3$* の発現量は増加したが、*laminin subunit $\alpha 3$* の発現量は低く *laminin subunit $\gamma 2$* は検出されなかった。また *vitronectin* は低い発現量を示した (図 4A, B)。さらに、3 人の異なるドナーを用いてリアルタイム RT-PCR を行い各種 *integrin* と *collagen type I $\alpha 1$* , *fibronectin 1* の発現量を検討したところ、ドナー1では *integrin $\alpha 3$* , *$\alpha 4$* , および *$\alpha 5$* , そして *collagen type I $\alpha 1$* と *fibronectin 1* の遺伝子発現量は PCR アレイと同様に増加した。ドナー2 でも同様の傾向が得られたが、*collagen type I $\alpha 1$* の発現量は減少した。一方、ドナー3 では *integrin $\alpha 2$* の発現量は増

加したものの、 $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ および *collagen type I $\alpha 1$* の発現量は減少した。したがって、今後の実験においては有意差を持って *integrin* の発現量が増加したドナー1の細胞を用いた ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey-Kramer test : 図 4C)。

細胞遊走時の *integrin* $\alpha 3$ および $\alpha 5$ の細胞内局在の変化

上述の遺伝子発現の解析結果から、歯周組織を構成する細胞の遊走に関与すると報告²⁷⁾がある *integrin* $\alpha 3$ および $\alpha 5$ について、歯根膜線維芽細胞における細胞内の局在の変化を、免疫蛍光染色法を用いて調べた。まず細胞の遊走時に、その移動方向に連動して局在が変化するゴルジ体を調べた²⁸⁾。ゴルジ体(赤色)は扇型に変形した方向に発現した(図 5A ; 赤*)。したがって、扇型に変形した部位が細胞遊走の先端部(リーディングエッジ)であることがわかった。そして、リーディングエッジと考えられる部位に *integrin* $\alpha 3$ が発現した(図 5A ; 黄矢じり)。次に、*integrin* $\alpha 3$ (緑色)と *integrin* $\alpha 5$ (赤色)の抗体を用いてそれぞれの細胞内の局在を二重染色法によって調べた。その結果、*integrin* $\alpha 3$ は細胞の遊走先端に、*integrin* $\alpha 5$ はそのやや細胞質内側に発現しており、これらの細胞内局在に差異があることがわかった(図 5A ; *integrin* $\alpha 3$, 黄矢じり / *integrin* $\alpha 5$, 赤矢じり)。さらに、*integrin* $\alpha 3$ のリガンドである laminin-5 は発現しなかったが vitronectin は細胞質周囲に発現し、

PDGF-BB 刺激によって変化はなかった。一方, integrin $\alpha 5$ のリガンドである

fibronectin (赤色) は PDGF-BB 刺激時に細胞遊走周囲に強く発現した (図 5B)。

PDGF-BB 刺激時における抗 integrin $\alpha 3$ と $\alpha 5$ 中和抗体が細胞遊走に及ぼす影響

インテグリンの機能阻害のために用いる isotype control IgG 抗体 (IgG), 抗 integrin $\alpha 3$ 中和抗体 (Ab-ITG $\alpha 3$), および抗 integrin $\alpha 5$ 中和抗体 (Ab-ITG $\alpha 5$) の細胞障害性を 5-20 ng/mL の濃度範囲で検討した。今回用いた全ての濃度の抗体は細胞障害性を示さなかった (有意差なし, ANOVA / Tukey-Kramer test : 図 6A)。さらに, PDGF-BB 刺激下での細胞遊走試験において, 上述の濃度の Ab-ITG $\alpha 3$ と Ab-ITG $\alpha 5$ を用いてそれぞれの機能を阻害すると, medium 群に比較して全ての刺激群で細胞遊走面積は増加した。また, isotype control 刺激群に比較して Ab-ITG $\alpha 3$ 刺激群では, 全ての濃度で細胞遊走面積は増加傾向にあるものの有意な変化はなかった。一方, Ab-ITG $\alpha 5$ 刺激群では 5 μ g/mL と 20 μ g/mL の濃度で細胞遊走面積は減少した。 ($p < 0.05$, ANOVA / Tukey-Kramer test : 図 6B, 6C)。

integrin $\alpha 3$ 阻害ペプチドが細胞遊走に及ぼす影響

integrin $\alpha 3$ と細胞膜上で結合しているウロキナーゼ受容体 (uPAR) にウロキナーゼ (uPA) の結合を阻害する integrin 阻害ペプチド ($\alpha 325$)²⁶⁾の細胞障害性を 2-20

$\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で検討した。その結果、今回用いた全ての濃度で細胞障害性を示さなかった（有意差なし，ANOVA / Tukey-Kramer test : 図 7A）。したがって、これらの濃度の $\alpha 325$ と Sc $\alpha 325$ を用いて歯根膜線維芽細胞を刺激すると，PDGF-BB 刺激群と同程度まで細胞遊走面積は増加した。さらに，Ab-ITG $\alpha 3$ によって刺激した場合も，濃度依存的に PDGF-BB 刺激群と同程度まで細胞遊走面積が増加した ($p < 0.05$ ，ANOVA / Tukey-Kramer test : 図 7B, 7C)。

Ca9-22 細胞において integrin $\alpha 3$ 阻害ペプチドが細胞遊走に及ぼす影響

integrin $\alpha 3$ は歯肉上皮細胞の遊走を促進する報告があるため²⁷⁾，歯肉由来細胞である Ca9-22 細胞において，20 $\mu\text{g/mL}$ の $\alpha 325$ による integrin $\alpha 3$ の機能阻害が細胞遊走に及ぼす影響を検討したところ， $\alpha 325$ は Ca9-22 の細胞遊走能に影響を与えなかった。（有意差なし，ANOVA / Tukey-Kramer test : 図 8A, 8B）。

考察

細胞遊走は、細胞内外の様々な分子が発現量と発現局在を変化させ、微小環境が協調することによって厳密に制御されているが、その詳細なメカニズムの解明には至っていない¹¹⁾。再生した組織の恒常性維持のために重要なインテグリンは、細胞遊走時に細胞内局在を変化することによって活性化されることが報告²⁹⁾されているが、インテグリンのサブユニットごとの発現局在が遊走メカニズムに及ぼす影響は不明なままである。すなわち、本研究で見出した、*integrin α3* と *integrin α5* が異なる部位で発現し、細胞遊走へ相反する影響を及ぼすという結果は、細胞遊走のメカニズムを解明する上で非常に重要であると考えられる。

本研究では、細胞が遊走する条件の確立のために、最も効果的に細胞遊走を起こす成長因子のスクリーニングを行った。使用した TGF-β1, FGF-2, BMP-2, PDGF-BB, および SDF-1 はそれぞれ歯根膜線維芽細胞や間葉系幹細胞の遊走に有効³⁰⁾であり、この中でも FGF-2¹⁹⁾ と PDGF-BB¹⁸⁾ は歯周組織での反応性が高く、臨床現場でもすでに応用されている。しかし、本研究においては、PDGF-BB 刺激時に最も細胞遊走が促進され、FGF-2 によっては顕著な変化がなかった (図 2)。FGF-2 による遊走能促進はマウス由来の歯根膜線維芽細胞で調べられているのみで、FGF-2 による細

胞増殖分化能と ECM 産生能の促進に関する報告が多い³¹⁾。すなわち、FGF-2 の歯根膜線維芽細胞に対する効果は、細胞遊走よりも細胞増殖の促進であると考えられる。したがって、本実験系では細胞が遊走する際のポジティブコントロールとして PDGF-BB を用いた。

PDGF-BB は臨床応用が進んでおり、細胞遊走を制御するメカニズムとして、Rho ファミリー G タンパク質の一つである Rac 1 が関与することが明らかになっている²⁵⁾。PDGF がレセプターに結合すると Rac シグナルを介してインテグリンを活性化させ、活性化したインテグリンは focal adhesion kinase (FAK) をリン酸化し、Rac シグナルを介してアクチンの重合を促進して細胞を遊走させる。このように、Rac 1 は、インテグリンの発現局在と活性化を制御する主要なシグナルである²⁵⁾が、その詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究において、PDGF-BB 刺激下で遊走する歯根膜線維芽細胞に Rac 1 阻害剤を添加すると、細胞遊走面積が有意に減少した (図 3A, B)。さらに、細胞遊走のメカニズムをより詳細に調べるために MC を用いて細胞増殖を阻害した状態で、PDGF-BB 刺激下の遊走運動をタイムラプス観察したところ、PDGF-BB 刺激群では、他の細胞に先立って、細胞集団の遊走方向を先導する細胞 (リーダー細胞³²⁾) が確認できた。リーダー細胞は、近年癌浸潤の研究³³⁾で注目を集めており、Rac 1 シグナルと integrin β 1 の発現増加を特徴とする

³⁴⁾。以上のことから、歯根膜線維芽細胞の遊走に關与するインテグリンの発現パターンは **Rac1** によって制御を受ける可能性がある。

PCR アレイ解析 (図 4) によって、**integrin α 2**, **α 3**, **α 4**, および **α 5** の遺伝子発現が増加し、これらの中で **integrin α 3** と **α 5** の発現量が多いことが明らかになった。

しかしながらリアルタイム RT-PCR を用いて上記の遺伝子発現量について検証したところドナー1, 2 に関しては同様の傾向は得られたが、ドナー3 では相反する結果となり、ドナーによるインテグリン発現量には差異があると推察した。インテグリンと ECM は恒常的に存在するものであるが、**integrin α 4** は間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に關与する ³⁵⁾ こと、そして **integrin α 5** は tumor necrosis factor - α による炎症刺激によって発現が増加し、歯根膜線維芽細胞の遊走を促進する ³⁶⁾ ことが知られている。一方で、**integrin α 2**, **integrin α 3** の歯根膜線維芽細胞における機能は未だ不明であるが、**integrin α 3** は歯肉上皮細胞の遊走を促進する ³⁷⁾ ことが分かっている。したがって、本研究ではこれらの知見から、歯根膜線維芽細胞の遊走を制御する候補遺伝子として **integrin α 3**, **α 5** に着目し、その機能を検討した。

細胞遊走において、Rho ファミリー G タンパク質の一つである cell division cycle 42 (Cdc42) は、細胞小器官の一つであるゴルジ体の局在を核の前縁に変化させ、微小管の成長を促進することによって細胞の進行方向を制御する ²⁸⁾。さらに、ゴル

ジ体は、細胞遊走時に連続的に繰り返される integrin の細胞内局在の変化や integrin $\beta 1$ の活性化に關与する³⁸⁾ことが分かっている。本研究では、ゴルジ体の局在で示された遊走方向の細胞端に integrin $\alpha 3$ 、その内方に integrin $\alpha 5$ が局在することが明らかになった(図 5 A)。すなわち、齒根膜線維芽細胞の遊走には integrin $\alpha 3$ と integrin $\alpha 5$ の局在の違いが關与している可能性が示唆された。

collagen I は齒根膜線維芽細胞が產生する主要な ECM であり、integrin $\alpha 5$ のリガンドである fibronectin は collagen I と接着し遊走を制御する³⁹⁾ことが知られている。また integrin $\alpha 3$ は様々な ECM (laminins, vitronectin, fibronectin および collagens) のレセプターである⁴⁰⁾。本研究で、PDGF-BB 刺激下の fibronectin の染色強像はより明瞭に得られたこと(図 5B)、integrin $\alpha 5$ の中和抗体を用いて阻害すると遊走能が抑制された(図 6B, C)ことから、齒根膜線維芽細胞における integrin $\alpha 5$ を介した齒根膜線維芽細胞の遊走には fibronectin が重要であると考えられる。一方、PDGF-BB 刺激下で integrin $\alpha 3$ の中和抗体を作用させると、遊走能がやや増加する傾向を示すものの顕著ではなかった(図 6 B, C)。そこで、細胞遊走に対する integrin $\alpha 3$ の直接的な効果を詳細に調べるために、PDGF-BB 刺激を行わずに、integrin $\alpha 3$ の中和抗体を用いると、細胞遊走能は顕著に促進され、さらにその効果は PDGF-BB と同程度であることがわかった(図 7 B, C)。integrin $\alpha 3$ は上皮細胞や間葉系幹細胞

胞の遊走を促進する報告⁴⁰⁾が多いにも関わらず、本研究では抑制的に作用することから、歯根膜線維芽細胞の遊走メカニズムを解明する上で重要なサブユニットと考えられる。

インテグリンと ECM 間の結合は、高分子量の巨大かつ複雑な構造体同士の結合である。これらは細胞機能に関与する様々な機能部位を複数箇所所有している上に、構造変化やプロテアーゼ分解によって結合特異性が変化する²⁹⁾ことから、RGD 配列に代表される個々の分子の機能部位における機能性ペプチド断片の解析が、インテグリンと ECM 間の結合による細胞機能制御の解明のためには非常に重要である^{12,14)}。この戦略に基づいてインテグリン機能を阻害するペプチドを検索したところ、 $\alpha 325$ を見出した⁴²⁾。 $\alpha 325$ は、integrin $\alpha 3$ と細胞膜上で結合しているウロキナーゼ受容体 (uPAR) にウロキナーゼ (uPA) が結合することを阻害した結果、間接的に integrin $\alpha 3$ と vitronectin の結合を抑制し、integrin $\alpha 3$ の働きを阻害するものである²⁶⁾ (図 9)。laminin-5 の染色像は得られず、vitronectin の染色強像が細胞質周囲に得られたことから integrin $\alpha 3$ のリガンドは vitronectin であると考えられる点からも、 $\alpha 325$ は歯根膜線維芽細胞における integrin $\alpha 3$ の機能解明において有用であると考えた (図 5B)。 $\alpha 325$ は、integrin $\alpha 3$ の中和抗体と同様に、PDGF-BB と同程度まで細胞遊走を促進した (図 7B, C)。 $\alpha 325$ と integrin $\alpha 3$ 中和抗体とが、共通の作用を示し

たことから、integrin $\alpha 3$ 中和抗体の認識部位は $\alpha 325$ ペプチド配列（表 2）を含む可能性がある。すなわち、これらの共通配列の解析は、integrin $\alpha 3$ による細胞遊走促進のための機能部位の同定に繋がると考えられる。さらに、uPAR は integrin $\alpha 5$ とともに細胞膜上で結合しており、uPA が uPAR に結合すると integrin $\alpha 5$ と fibronectin の結合が強固になる⁴³⁾ ことから、integrin $\alpha 3$ 阻害時に細胞遊走能が促進されるメカニズムに、uPA を介した integrin $\alpha 5$ – fibronectin 結合によるポジティブフィードバック作用が間接的に関与している可能性が示唆される。

歯周組織の恒常性維持と再生には結合組織性付着が必要である。しかし歯肉上皮細胞のターンオーバーが歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞などの間葉系細胞よりも早いために、創傷治癒形態は、歯肉上皮が深行増殖した長い上皮性付着となり、間葉系組織の再生と結合組織性付着の阻害が生じる^{6,7)}。すなわち、歯根膜線維芽細胞を欠損部に遊走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である。本研究で、歯肉上皮由来細胞に $\alpha 325$ を作用させても、遊走能に変化がなかったことから（図 8）、本研究で用いた $\alpha 325$ ペプチドは、in vivo での適応においても有効な可能性がある。

以上の結果から、PDGF-BB による歯根膜線維芽細胞の遊走は integrin $\alpha 3$ と integrin $\alpha 5$ によって制御され、integrin $\alpha 3$ は抑制的に、また integrin $\alpha 5$ は促進的に作

用することが明らかになった。これらのメカニズムには integrin $\alpha 3$ と uPA および vitronectin の結合による抑制作用, そして integrin $\alpha 5$ と fibronectin との結合による促進作用が関与する可能性がある。また, integrin $\alpha 3$ を阻害することは, 歯肉上皮細胞の深部増殖を抑制し歯周組織の恒常性維持のために重要な歯根膜線維芽細胞による結合組織性付着を獲得するために有効である可能性が示された。

結論

歯根膜線維芽細胞が遊走時に発現するインテグリンは $\alpha 3$ と $\alpha 5$ であり、インテグリン

$\alpha 3$ は歯根膜線維芽細胞の遊走を抑制し、インテグリン $\alpha 5$ は遊走を促進する。

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いたします。また，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，大森一弘講師，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，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。

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 142 回日本歯科保存会春期学術大会（2015 年 6 月，福岡）
- 第 59 回日本歯周病学会春季学術大会（2016 年 5 月，鹿児島）

参考文献

- 1) Lamont, R.J., and Hajishengallis, G.: Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol. Med.*, **21**, 172-183, 2015.
- 2) Geoffrey, C.G., Sabine, W., Yann, B., and Michael, T. L.: Wound repair and regeneration. *Nature*, **453**, 314-321, 2008.
- 3) Heng, M.C.: Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. *Int. J. Dermatol.*, **50**, 1058-1066, 2011.
- 4) Schroeder, H.E., and Listgarten, M.A.: The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol. 2000*, **13**, 91-120, 1997.
- 5) Sculean, A., Nikolidakis, D., and Schwarz, F.: Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J. Clin. Periodontol.*, **35**, 106-116, 2008.
- 6) Melcher, A. H.: On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.*, **47**, 256-260, 1976.
- 7) Pitaru, S., McCulloch, C.A., and Narayanan, S.A.: Cellular origins and differentiation

- control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J. Periodontal Res.*, **29**, 81-94, 1994.
- 8) Lekic, P.C., Pender, N., and McCulloch, C.A.: Is fibroblast heterogeneity relevant to the health, diseases, and treatments of periodontal tissues? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **8**, 253-268, 1997.
- 9) Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y., and Shi, S.: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, **364**, 149-155, 2004.
- 10) Bassir, S.H., Wisitrasameewong, W., Raanan, J., Ghaffarigarakani, S., Chung, J., Freire, M., Andrada, L.C., and Intini, G.: Potential for stem cell-based periodontal therapy. *J. Cell Physiol.*, **231**, 50-61, 2016.
- 11) Lutolf, M.P., and Hubbell, J.A.: Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 47-55, 2005.
- 12) Discher, D.E., Mooney, D.J., Zandstra, P.W., Gross, S., Gammon, S.T., Moss, B.L., Rauch, D., Harding, J., and Heinecke, J.W.: Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, **324**, 1673-1677, 2009.

- 13) Hynes, R.O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**, 673-687, 2002.
- 14) Ruoslahti, E.: RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 697-715, 1996.
- 15) Ivanovski, S., Komaki, M., Bartold, P.M., and Narayanan, A.S.: Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via alpha 5 beta 1 integrin. *J. Periodontal Res.*, **34**, 154-159, 1999.
- 16) Oates, T.W., Rouse, C.A., and Cochran, D.L.: Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J. Periodontol.*, **64**, 142-148, 1993.
- 17) Inukai, T., Katagiri, W., Yoshimi, R., Osugi, M., Kawai, T., Hibi, H., and Ueda, M.: Novel application of stem cell-derived factors for periodontal regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 763-768, 2013.
- 18) Nevins, M., Giannobile, W.V., McGuire, M.K., Kao, R.T., Mellonig, J.T., Hinrichs, J.E., McAllister, B.S., Murphy, K.S., McClain, P.K., Nevins, M.L., Paquette, D.W., Han, T.J., Reddy, M.S., Lavin, P.T., Genco, R.J., and Lynch, S.E.: Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *J. Periodontol.*, **76**, 2205-2215, 2005.

- 19) Kitamura, M., Akamatsu, M., Kawanami, M., Furuichi, Y., Fujii, T., Mori, M., Kunimatsu, K., Shimauchi, H., Ogata, Y., Yamamoto, M., Nakagawa, T., Sato, S., Ito, K., Ogasawara, T., Izumi, Y., Gomi, K., Yamazaki, K., Yoshie, H., Fukuda, M., Noguchi, T., Takashiba, S., Kurihara, H., Nagata, T., Hamachi, T., Maeda, K., Yokota, M., Sakagami, R., Hara, Y., Noguchi, K., Furuuchi, T., Sasano, T., Imai, E., Ohmae, M., Koizumi, H., Watanuki, and M., Murakami, S.: Randomized placebo-controlled and controlled non-inferiority phase III trials comparing trafermin, a recombinant human fibroblast growth factor 2, and enamel matrix derivative in periodontal regeneration in intrabony defects. *J. Bone Miner. Res.*, **31**, 806-814, 2016.
- 20) Nishimura, F., Terranova, V., Foo, H., Kurihara, M., Kurihara, H., and Murayama, Y.: Glucose-mediated alteration of cellular function in human periodontal ligament cells. *J. Dent. Res.*, **75**, 1664-1671, 1996.
- 21) Schmidt, A., Ladage, D., Schinköthe, T., Klausmann, U., Ulrichs, C., Klinz, F.J., Brixius, K., Arnhold, S., Desai, B., Mehlhorn, U., Schwinger, R.H., Staib, P., Addicks, K., and Bloch, W.: Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, **24**, 1750-1758, 2006.
- 22) Du, L., Yang, P., and Ge, S.J.: Stromal cell-derived factor-1 significantly induces

- proliferation, migration, and collagen type I expression in a human periodontal ligament stem cell subpopulation. *J. Periodontol.*, **83**, 379-388, 2012.
- 23) Park, J.C., Kim, J.M., Jung, I.H., Kim, J.C., Choi, S.H., Cho, K.S., and Kim, C.S.: Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J. Clin. Periodontol.*, **38**, 721-31, 2011.
- 24) Cai, K., and Dynlacht, B.D.: Activity and nature of p21(WAF1) complexes during the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 12254-122549, 1998.
- 25) Anand, A.B., Zetter, B.R., Viswanathan, A., Qiu, R.G., Chen, J., Ruggieri, R., and Symons, M.: Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the Rac and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30688-30692, 1997.
- 26) Wei, Y., Eble, J.A., Wang, Z., Kreidberg, J.A., and Chapman, H.A.: Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2975-2986, 2001.
- 27) Larjava, H., Koivisto, L., Heino, J., and Häkkinen, L.: Integrins in periodontal disease. *Exp. Cell Res.*, **325**, 104-110, 2014.

- 28) Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R.: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, **302**, 1704-9, 2003.
- 29) Bouvard, D., Pouwels, J., De, F.N, and Ivaska, J.: Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 430-442, 2013.
- 30) Smith, P.C., Martínez, C., Cáceres, M., and Martínez, J.: Research on growth factors in periodontology. *Periodontol. 2000*, **67**, 234-250, 2015.
- 31) Murakami, S.: Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol. 2000*, **56**, 188-208, 2011.
- 32) Gov, N.S.: Collective cell migration patterns. follow the leader. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 15970-15971, 2007.
- 33) Friedl, P., and Gilmour, D.: Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 445-457, 2009.
- 34) Yamaguchi, N., Mizutani, T., Kawabata, K., and Haga, H.: Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin β 1 and PI3K. *Sci. Rep.*, **5**, 7656, 2015.

- 35) Kumar, S., and Ponnazhagan, S.: Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression. *FASEB. J.*, **21**, 3917-3927, 2007.
- 36) Takemura, A., Nakagawa, I., Kawai, S., Inaba, H., Kato, T., Hamada, S., and Amano, A.: Inhibitory effects of tumor necrosis factor-alpha on migration of human periodontal ligament cells. *J. Periodontol.*, **77**, 883-890, 2006.
- 37) Larjava, H., Koivisto, L., Häkkinen, L., and Heino, J.: Epithelial integrins with special reference to oral epithelia. *J. Dent. Res.*, **90**, 1367-1376, 2011.
- 38) Grieve, A.G., and Rabouille, C.: Golgi bypass: skirting around the heart of classical secretion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, 1-15, 2011.
- 39) Schwarzbauer, J.E., and DeSimone, D.W.: Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, 1-19, 2011.
- 40) DiPersio, C.M., Shah, S., and Hynes, R.O.: alpha 3A beta 1 integrin localizes to focal contacts in response to diverse extracellular matrix proteins. *J. Cell Sci.*, **108**, 2321-2336, 1995.
- 41) Kreidberg, J.A.: Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 548-53, 2000.
- 42) Tarui, T., Andronicos, N., Czekay, R.P., Mazar, A.P., Bdeir, K., Parry, G.C., Kuo, A.,

Loskutoff, D.J., Cines, D.B., and Takada, Y.: Critical role of integrin alpha 5 beta 1 in urokinase (uPA)/urokinase receptor (uPAR, CD87) signaling. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29863-29872, 2003.

- 43) Smith, H.W., and Marshall, C.J.: Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 23-36, 2010.

図の説明

図 1. 細胞遊走試験のプロトコル

歯根膜線維芽細胞を 0.1 % FBS で 24 時間培養後、細胞侵入を排除するためのストッパーが well 中央部に設置された 96-well マルチプレートに 3.75×10^4 cells/cm² で細胞を播種した。9 時間培養後、細胞増殖阻害剤である MC を 1 時間作用させた後にストッパーを除去し、遊走因子、およびインテグリンの中和抗体、もしくは阻害ペプチドで刺激した。刺激 38 時間後にカルセインで染色し、検出域内に遊走した細胞の遊走面積を定量解析した。なお、各種遊走刺激因子による細胞遊走試験 (図 2) は MC 無添加の条件で行った。

図 2. 各種遊走刺激因子による細胞遊走面積の定量解析

(A) 歯根膜線維芽細胞を図 1 の MC 無添加の条件で培養し、TGF- β 1, BMP-2, PDGF-BB, FGF-2, および SDF-1 のそれぞれによって刺激後 38 時間における細胞活性を MTS 法によって測定し、490 nm における吸光度 (OD₄₉₀) は medium 群を基準とした比で表した。3 人のドナー由来の独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。* : $p < 0.05$ (medium 群との比較), Student's *t*-test,

ANOVA / Tukey-Kramer test

(B) 歯根膜線維芽細胞を図 1 の MC 無添加の条件で培養し, TGF- β 1, BMP-2, PDGF-BB, FGF-2, および SDF-1 それぞれによって刺激後のカルセイン染色像を示す。染色像は独立した 3 回の培養-染色系の典型像である。スケールバー : 20 μ m

(C) の染色像を ImageJ software を用いて, 遊走細胞の面積を算出し, 定量解析を行った。グラフは, medium 群を基準とした面積比を算出した。異なる 3 名のドナー由来の歯根膜線維芽細胞を用いて, 独立した 4 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。*: $p < 0.05$ (medium 群との比較), ANOVA / Tukey-Kramer test

図 3. 細胞遊走運動のタイムラプス撮影

(A) 歯根膜線維芽細胞を 10 μ M の Rac1 阻害剤存在下で, 図 1 の方法にしたがって培養し, 10 ng/mL の PDGF-BB を用いて刺激した。刺激 38 時間後のカルセイン染色像を示す。染色像は独立した 3 回の培養-染色系の典型像である。スケールバー : 20 μ m

(B) (A) の染色像を ImageJ software を用いて, 遊走細胞の面積を算出し, 定量解析を行った。グラフは, PDGF-BB 群を基準とした面積比で表した。独立した 3

回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。* : $p < 0.05$ (PDGF-BB 群との比較), Student's *t*-test

(C) 歯根膜線維芽細胞を図 1 に従い培養し、10 ng/mL の PDGF-BB と 0 – 5 μ g の MC とを添加後 38 時間における細胞活性を MTS 法によって測定し、490 nm における吸光度 (OD_{490}) を、medium 群を基準とした比で表した。3 人のドナー由来の独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。* : $p < 0.05$ (medium 群との比較), ANOVA / Tukey-Kramer test

(D) 歯根膜線維芽細胞を図 1 に従い培養し、PDGF-BB (10 ng/mL) 刺激による歯根膜線維芽細胞の遊走運動を観察するために、明視野でタイムラプス撮影 (撮影間隔 ; 15 分, 10 frame / sec) を行った。半円の内側がストッパーで確保されていた検出域を示す。撮影画像は独立した 3 回の実験系の典型像である。

図 4. PDGF-BB 刺激によって発現量が増減する ECM と細胞接着因子の解析

(A) PCR アレイ解析によって得た遺伝子発現の増減データを基に作成した Scatter Plot を示す。縦軸は PDGF-BB 刺激により増減した遺伝子発現量を、横軸は無刺激 (medium) における遺伝子発現量を対数表記で示す。グラフの中心 45 度を表す線は Ratio = 1 を指し、上下に平行移動した 2 本の線は 2 倍以上の発現を表す。

(赤丸：遺伝子発現量が2倍以上増加したもの、緑丸：遺伝子発現量が2倍以上減少したもの、■：遺伝子発現量の変化が2倍未満のもの)

(B) PDGF-BB 刺激 8 時間後の歯根膜線維芽細胞の total RNA を回収して、PCR アレイを用いて ECM と細胞接着因子の遺伝子発現量を調べた。medium 群と PDGF-BB 刺激群の発現量の比較を表に示す。発現量が 2 倍以上変化し、解析ソフトウェア (PCR Array Data Analysis Web Portal-version 3.5) での分析結果が OKAY と示された遺伝子のみ表記した。

(C) (B) と同様の方法で Total RNA を回収して、PCR アレイで変化が見られた integrin とリガンドである ECM の遺伝子発現量を調べた。グラフは、各遺伝子の発現量を GAPDH の発現量で補正し、medium 群の発現量を基準とした比を算出した

(■：medium 群, □：ドナー1 群, ■：ドナー2 刺激群, ▨：ドナー3 刺激群)。なお、異なる 3 名のドナー由来の歯根膜線維芽細胞を用いて、独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$ (medium 群との比較), † : $p < 0.005$ (ドナー1 との比較), ANOVA / Tukey-Kramer test

図 5. 細胞遊走時に発現するインテグリンと ECM の細胞内局在

PDGF-BBにて刺激を行い、遊走した細胞で発現する Integrin $\alpha 3$, $\alpha 5$ との細胞内局在の変化を、免疫蛍光染色法を用いて調べた。

(A) 細胞の進行方向に発現するゴルジ体 (赤色) と Integrin $\alpha 3$ (緑色) と DAPI (青色) の重ね合わせ像を示す。(白矢印: 細胞の進行方向, 赤矢じり: ゴルジ体, 黄矢じり: Integrin $\alpha 3$) 対照 (上段) と PDGF-BB 添加 (下段) において, Integrin $\alpha 3$ (緑色), $\alpha 5$ (赤色), DAPI (青色) の重ね合わせ像を示す。共局在は黄色で示す。(黄矢じり: Integrin $\alpha 3$, 赤矢じり: ゴルジ体)

(B) Integrin $\alpha 3$ (緑色) のリガンドである Vitoronectin (赤色) と Integrin $\alpha 5$ (緑色) のリガンドである Fibronectin (赤色) とそれぞれの DAPI (青色) の重ね合わせ像を示す。

(A), (B), (C) はともに 3 回の培養-染色系の典型像を示す。(スケールバー: 5 μm)

図 6. 抗インテグリン中和抗体作用時の細胞遊走面積の定量解析

(A) 歯根膜線維芽細胞を図 1 に従い培養し, 5 – 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗マウス Isotype Control 抗体 (IgG Mouse) と抗 Integrin $\alpha 3$ 抗体 (Ab-ITG $\alpha 3$), および抗ラビット Isotype Control 抗体 (IgG Rabbit) と抗 Integrin $\alpha 5$ 抗体 (Ab-ITG $\alpha 5$) によってそれぞれ刺激

後 38 時間における細胞活性を MTS 法によって測定し、490 nm における吸光度 (OD₄₉₀) を、medium 群を基準とした比で表した。3 人のドナー由来の独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。有意差なし (medium 群との比較), ANOVA / Tukey-Kramer test

(B) 歯根膜線維芽細胞を図 1 に従い培養し、10 ng/mL の PDGF-BB と同時に、IgG Mouse, Ab-ITG α 3, IgG Rabbit, Ab-ITG α 5, を用いてそれぞれ刺激した。刺激 38 時間後のカルセイン染色像を示す。染色像は独立した 3 回の培養-染色系の典型像である。スケールバー : 20 μ m

(C) (B) の染色像を ImageJ software を用いて、遊走細胞の面積を算出し、定量解析を行った。グラフは、medium 群を基準とした面積比を算出した。独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。† : $p < 0.05$, † † : $p < 0.005$ (medium 群との比較), * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$ (Isotype Control 抗体との比較), ANOVA / Tukey-Kramer test

図 7. integrin α 3 の機能阻害時の細胞遊走面積の定量解析

(A) 歯根膜線維芽細胞を図 1 に従い培養し、Integrin α 3 阻害ペプチド (α 325) の刺激後 38 時間における細胞活性を MTS 法によって測定し、490 nm における吸

光度 (OD₄₉₀) を, medium 群を基準とした比で表した。3 人のドナー由来の独立した 3 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。有意差なし (medium 群との比較), ANOVA / Tukey-Kramer test

(B) 歯根膜線維芽細胞を図 1 に従い培養し, PDGF-BB (10 ng/mL), スクランブルペプチド (Sc α 325) と α 325, そして IgG Mouse, Ab-ITG α 3 のそれぞれで刺激した 38 時間後のカルセイン染色像を示す。染色像は独立した 3 回の培養-染色系の典型像である。スケールバー : 20 μ m

(C) (B) の染色像を ImageJ software を用いて, 遊走細胞の面積を算出し, 定量解析を行った。グラフは, medium 群を基準とした面積比を算出した。独立した 3 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。† : $p < 0.05$, † † : $p < 0.005$

(medium 群との比較), * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$ (Sc α 325 および Isotype Control 抗体群との比較), ANOVA / Tukey-Kramer test

図 8. integrin α 3 阻害時の歯肉上皮細胞の遊走面積の定量解析

(A) 歯肉由来細胞として, Ca9-22 を図 1 に従い培養し, PDGF-BB (10 ng/mL), スクランブルペプチド (Sc α 325), Integrin α 3 阻害ペプチド (α 325) を用いてそれ

ぞれ刺激した 38 時間後のカルセイン染色像を示す。染色像は独立した 3 回の培養-染色系の典型像である。スケールバー：20 μm

(B) (A) の染色像を ImageJ software を用いて、遊走細胞の面積を算出し、定量解析を行った。medium 群を基準とした面積比を算出した。独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。有意差なし (medium 群との比較)。
ANOVA / Tukey-Kramer test

図 9. 歯根膜線維芽細胞の細胞遊走を制御する微小環境の推定図

PDGF-BB, Integrin $\alpha 3\beta 1$, および Integrin $\alpha 5\beta 1$ は Rac シグナルを介してアクチン線維を活性化し、細胞遊走を促進する。また、PDGF-BB はインテグリンの活性化にも関与する (点線矢印)。Integrin $\alpha 3\beta 1$ は uPAR によって活性化を受け、Vitronectin と結合した結果、focal adhesion kinase (FAK) がリン酸化され細胞接着が促進される。Integrin $\alpha 5\beta 1$ と Fibronectin が結合し、FAK がリン酸化され Rac シグナルが活性化する (実線矢印)。このように、細胞周囲の微小環境が同調することで細胞遊走が促進される。

図 10. integrin $\alpha 3\beta 1$ の阻害が歯周組織に及ぼす影響

歯周治療において、 $\text{integrin}\alpha3\beta1$ を阻害することは、歯肉上皮細胞の深部増殖を抑制し、歯根膜線維芽細胞の遊走が促進されることによって、歯周組織の恒常性維持のために重要な結合組織性付着の獲得に有効である可能性が示された。