

Title	Immunolocalization of laminin and integrin in regenerating junctional epithelium of mice after gingivectomy
Author(s)	正岡, 孝康
Journal	歯科学報, 109(5): 526-527
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/1898">http://hdl.handle.net/10130/1898</a>
Right	

氏名(本籍)	まさ おか たか やす 正 岡 孝 康 (愛媛県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1766号(甲第1041号)
学位授与の日付	平成20年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Immunolocalization of laminin and integrin in regenerating junctional epithelium of mice after gingivectomy
掲載雑誌名	Journal of periodontal research 第44巻 4号 489~495頁 2009年8月
論文審査委員	(主査) 山田 了教授 (副査) 井上 孝教授 中川 寛一教授 柴原 孝彦教授 下野 正基教授

## 論文内容の要旨

### 1. 研究目的

付着上皮は、エナメル質表面と内側基板(ABL)を介して接着することにより、歯周組織の恒常性の維持と防御機構において重要な役割を果たしている。また、エナメル質に面する付着上皮の最表層に配列する細胞はDAT(Directly Attached to the Tooth)細胞と呼ばれ、歯面に付着しながら、歯冠側へ移動することが知られている。

付着上皮細胞のエナメル質表面への接着にはヘミデスマゾームの形成と共に、laminin-5をはじめとする細胞外マトリックスと細胞表面に存在する接着タンパクのintegrinが関与することが知られている。Laminin-5は $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_2$ の3つのサブユニットで構成され、そのうち $\gamma_2$ 鎖はlaminin-5に特有で、integrin  $\alpha_6\beta_4$ , integrin  $\alpha_3\beta_1$ と結合し、細胞接着や細胞移動を担うと考えられている。

これまでに、歯肉切除後の再生付着上皮を電子顕微鏡的に検索した報告は多々みられるが、歯肉切除後の再生付着上皮におけるlaminin, integrinの免疫局在を検索した報告はない。これは、従来の固定・脱灰を行う標本ではエナメル質が溶解消失してしまうと共に、タンパク質が変性し、免疫染色時に抗原性の低下・消失をきたし、染色性の低下を生じることから、エナメル質と再生付着上皮との界面におけるこれらの免疫局在を詳細に検索することが難しいと考えられていたからである。一方、未固定非脱灰の場合、硬組織を含んだ試料の薄切が非常に困難であるという技術的な問題がある。

そこで、本研究ではマウスの歯肉切除後に再生する付着上皮の歯面および上皮結合組織への再接着機構を解明するため、タングステンナイフを使用し、未固定非脱灰凍結切片を作製し、粘着フィルムに切片採取する川本の方法(以下川本法と記す)を用い、laminin  $\gamma_2$ , integrin  $\beta_4$ , integrin  $\alpha_3$ および上皮結合部の基底膜の基本的構成要素の一つであるlaminin-1の免疫局在の変化を検討した。

### 2. 研究方法

実験動物は、8週齢のICR系雄マウス60匹を用いた。チオペンタールにて腹腔麻酔をおこなったのち実体顕微鏡下で、上顎第一臼歯、第二臼歯の口蓋側歯肉を実態顕微鏡下にて歯肉縁より1mm離れた部分で臼歯の外形に沿った弧状の切開を行い、歯肉を除去した。対照群(無処置)および術後1, 3, 5, 7, 14日に、屠殺後、顎骨を取り出し、前頭断にて川本法による未固定非脱灰凍結標本を作製し、抗laminin-1, laminin  $\gamma_2$ , in-

tegrin  $\beta_4$ , integrin  $\alpha_3$ 抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察撮影した。また、一部は通法に従い、10%中性緩衝ホルマリンにて灌流固定後、10%EDTAにより脱灰、パラフィン包埋後、前頭断にて切片を作製し、H-E染色後、光学顕微鏡にて観察した。

### 3. 研究成績および結論

免疫蛍光染色の結果より、創傷治癒初期(術後1~3日)では、多量の laminin  $\gamma_2$ が再生歯肉上皮細胞辺縁、結合組織中および根面にびまん性に分泌され、integrin  $\beta_4$ , integrin  $\alpha_3$ は再生歯肉上皮先端の細胞辺縁に強く発現したが、術後5日以降では、IBL・外側基板(EBL)に局在して認められた。これは、創傷治癒初期ではヘミデスモゾーム・基板の形成が不完全で、細胞の極性を欠いた状態であったが、治癒が進み、ヘミデスモゾーム・基板が形成されることにより、細胞の極性が生じ、laminin  $\gamma_2$ , integrin  $\beta_4$ , integrin  $\alpha_3$ がIBL・EBL側に局在するようになったと考えられた。また、術後7日では、laminin  $\gamma_2$ が再生付着上皮のIBL部に先行して発現し、続いて術後14日に integrin  $\beta_4$ , integrin  $\alpha_3$ がEBL部に認められるようになった。このことから、まず初めに再生付着上皮よりエナメル表面に laminin-5 が分泌されることで、ヘミデスモゾームの形成が開始され、続いて laminin-5 と integrin  $\alpha_6\beta_1$  及び integrin  $\alpha_3\beta_1$  との結合により歯面における上皮細胞が接着し、移動するものと考えられた。

## 論文審査の要旨

本研究では、歯肉切除後の再生上皮の歯面および上皮下結合組織との再接着機構を解明するため、治癒過程における laminin  $\gamma_2$ , integrin  $\beta_4$ , integrin  $\alpha_3$ , laminin-1 の免疫局在を未固定非脱灰凍結切片を用いて検討したものである。ICR系雄マウス60匹を用い、上顎第1、第2臼歯部の口蓋側歯肉を付着上皮を含めて切除し、術後1日、3日、5日、7日、14日および対照群(無処置)において、川本法による未固定非脱灰凍結標本作製し、抗 laminin-1, laminin  $\gamma_2$ , integrin  $\beta_4$ , integrin  $\alpha_3$ 抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察撮影し、免疫局在を検討した。

本研究の結果より、創傷治癒初期では、多量の laminin  $\gamma_2$ が再生歯肉上皮細胞辺縁、結合組織中および根面に分泌され、integrin  $\beta_4$ , integrin  $\alpha_3$ が再生歯肉上皮先端の細胞辺縁に強く発現するが、術後では、内側基板(EBL)・外側基板(EBL)に局在が認められた。これは、創傷治癒初期ではヘミデスモゾーム・基板の形成が不完全で、細胞の極性を欠いた状態であったが、治癒が進み、ヘミデスモゾーム・基板が形成されることにより、細胞の極性が生じ、laminin  $\gamma_2$ , integrin  $\beta_4$ , integrin  $\alpha_3$ の IBL・EBL 側への局在が起きたと考えられた。また、創傷治癒後期では、まず初めに laminin  $\gamma_2$ が再生付着上皮のIBL部に発現し、続いて integrin  $\beta_4$ , integrin  $\alpha_3$ が認められた。このことから、エナメル表面に laminin-5 が分泌され、ヘミデスモゾームの形成が開始され、再生付着上皮細胞は laminin-5 と integrin  $\alpha_6\beta_1$ , integrin  $\alpha_3\beta_1$  との結合により歯面における細胞の接着・移動が起ることが示された。

本審査委員会では、1) 歯肉切除の術式について、2) 創傷の治癒における結合組織の動態について、3) laminin  $\gamma_2$ の結合組織中における発現の解釈、4) DAT cell と再生付着上皮の関連、5) 免疫蛍光染色の陽性反応の定量化、6) 本研究の臨床的意義などについての討議および質疑がなされ、概ね妥当な回答が得られた。また、文章および写真の表現などについても適切な指摘があり、修正がなされた。

本研究で得られた知見は、歯科医学の進歩発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定された。