

培養歯肉上皮細胞の細胞運動におよぼす 低出力レーザーの影響

土肥宏樹 齋藤 勇¹ 西上堅二 月田秀夫
田中三千三郎 安部仁晴 中川敏浩 山本茂久

Low-power Laser Accelerates Cell Motility of Gingival Keratinocytes *in vitro*

Hiroki DOHI, Isamu SAITO¹, Kenji NISHIGAMI, Hideo TSUKIDA,
Michisaburo TANAKA, Kimiharu AMBE, Toshihiro NAKAGAWA and Shigehisa YAMAMOTO

Low-power laser irradiation on oral mucosae is supposed to have healing effects caused by accelerating cell growth. However, the mechanism of epithelial cell growth caused by laser irradiation is unknown. The aim of this study is to solve effects of low-power laser irradiation on epithelial cell motility which is an important factor in wound healing.

Experimental cells were normal human gingival keratinocytes, cultured in keratinocyte growth medium-2 for 2 days. Low-power laser device was trinpl D[®] (905nm, GaAlAs diode, average 2.4mW, YOSHIDA, Tokyo). The cell motility of gingival keratinocytes *in vitro* were examined by phase contrast microscopy with CCD camera, and the serials image of the same cell photographed every 10 minutes for 360 minutes were analyzed by image analysis software program. Cdc42/Rac which is a member of the Rho family in gingival keratinocytes was examined by confocal laser scanning microscopy using antibody.

Cells in non-irradiation group moved toward their forming filopodia and lamellipodia at average speed of 55 μ m/hr through examination period. In irradiation group, the speed of cell movement increased after laser irradiation, and reached a peak of 90 μ m/hr in 30 minutes. Afterwards, the speed reduced and was almost the same as non-irradiation group in 300 minutes later. On the other hand, Cdc42/Rac in non-irradiation group was expressed on a part of lamellipodia region of the cell. In irradiation group, expression of Cdc42/Rac was more than in non-irradiation group.

From these results, low-power laser irradiation appeared to accelerate cell motility of gingival keratinocyte. Further, low-power laser may influence signal transduction of Rho family related to cell motility in wound healing.

Key words : low-power laser, *in vitro*, cell motility, Cdc42/Rac, gingival keratinocyte

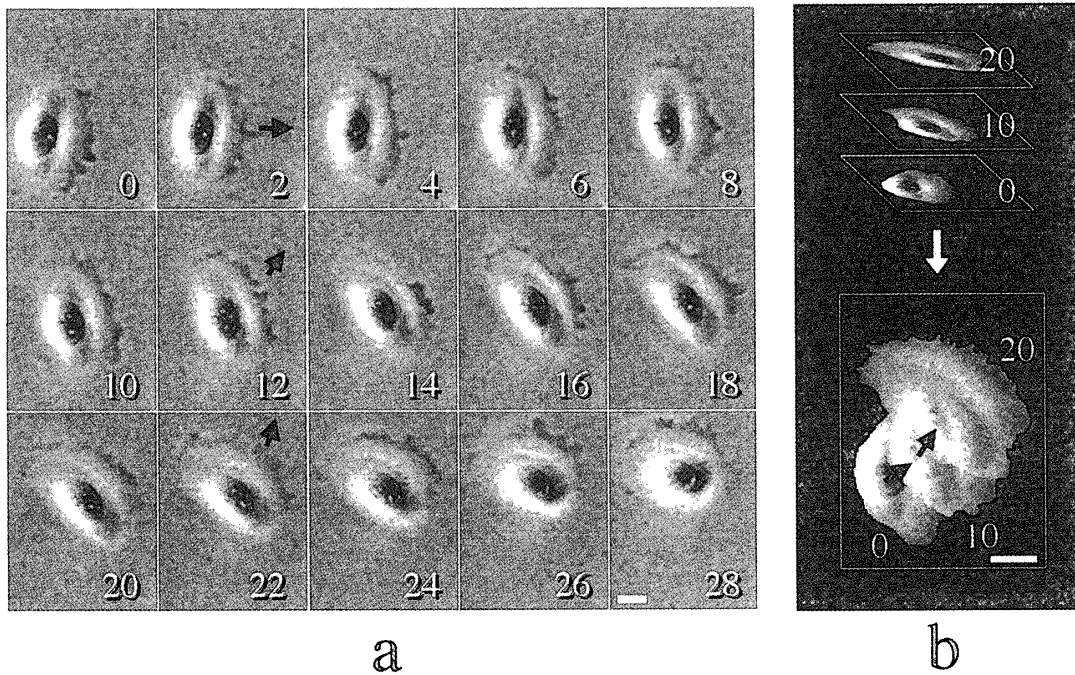


図1 上皮細胞および重ね合わせ画像

a : 2分毎の位相差顕微鏡像(0~28分後), 矢印: 移動方向

b : aの0, 10, 20分後の画像(上段)を重ねると黒矢印の方向に細胞が移動する様子が観察できる(下段)

Bar=20 μ m

緒言

低出力レーザーは、歯科臨床において、口内炎、歯肉炎、抜歯創などに対し照射され、治癒促進効果を有するとの報告¹⁻⁴⁾があるものの、その生物学的メカニズムについては十分に解明されていない。口腔粘膜における損傷部の治癒過程においては、上皮細胞が重要な役割を果たし、増殖や分化はもちろんのこと、創面を覆うために上皮細胞の移動が必要となる^{5,6)}。細胞が移動するには、細胞と基質との接着、移動、脱接着といった細胞運動のプロセスが重要となる^{7,8)}。これまで我々は、レーザーの治癒促進効果を解明する目的で、低出力レーザー照射後の上皮細胞における増殖および細胞接着関連因子などについて報告してきた⁹⁻¹¹⁾。今回は、細胞運動に着目し、細胞の移動、および細胞運動と関連の深いCdc42/Racにおよぼすレーザーの影響について、培養上皮細胞を用い検討した。

材料および方法

1. 細胞と培養

細胞は歯肉組織より採取した正常ヒト歯肉由来

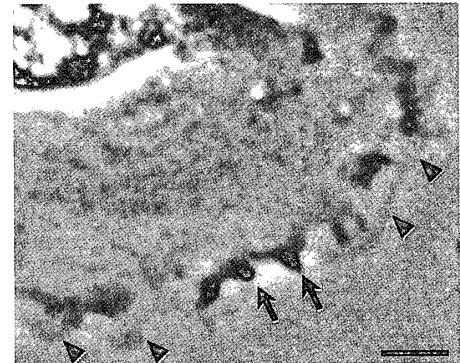


図2 上皮細胞の辺縁部の位相差顕微鏡像

矢印: フィロポディア, 矢頭: ラメリポディア,
Bar=20 μ m

上皮細胞¹⁰⁾を用い、培地はKGM-2(keratinocyte growth medium-2, Clonetics, USA)を使用した。培養は37 $^{\circ}$ C, 湿度100%, 5%CO₂下にて行い、継代に0.1%トリプシン-0.02%EDTA-PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)を使用した。 ϕ 35mmディッシュ(MS10350, SUMILON, 東京)に5 \times 10³個/cm²の割合で細胞を播種し、2日間培養を行った後、以下の実験に使用した。

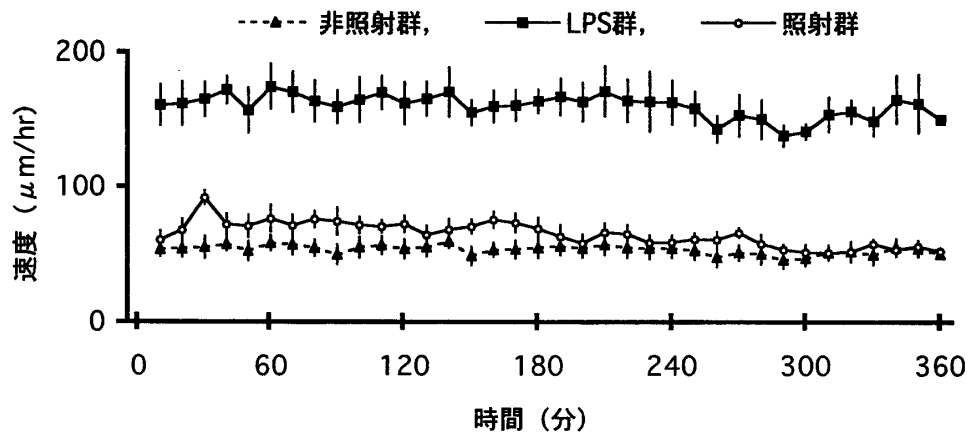


図3 細胞の移動速度

2. 低出力レーザー装置

レーザー装置はtrinpl D®(YOSHIDA, 東京)を用いた。仕様は、発振源：GaAlAs半導体、波長：905nm, 周波数：1200Hz, 波形：パルス波, パルス幅：200nsec, 平均出力：2.4mW, 照射口径：φ 6 mm, エネルギー密度：1.25J/cm²(150秒)である。

3. レーザー照射方法

ディッシュ底面にレーザー照射部位を刻印後、ディッシュ底面にレーザー照射口を接し、60秒間¹⁰⁾レーザーを照射した。なお、本実験では、エネルギー密度は500mJ/cm²である。

4. 細胞運動の記録

細胞運動の記録にあたっては、37°C, 湿度100%, 5%CO₂のチャンバー内にディッシュを静置し、倒立型位相差顕微鏡にCCDカメラ(HD CAMERA MODEL HQ-130C, Nikon, 東京)を装着し、MacSCOPE(三谷商事, 福井)のソフトウェアを用い、コンピュータにて2分毎に360分間、同一視野の画像を取得した。

5. 細胞運動の画像解析および処理

細胞運動の画像解析および処理は、Kiossesらの方法¹²⁾に準じて行った。すなわち、Adobe Photoshop 3.0 J(アドビシステムズ, 東京)のソフトウェアを使用し、10分毎の細胞のアウトラインを抽出後、MacSCOPEにて細胞の重心をプロットした後、10分毎の細胞の重心移動距離から細胞の移動速度(μm/hr)を算出した。また、連続的に細胞運動を観察するために、NIHImage(National

Institute of Health, USA)にて、10分毎および30分毎における細胞の画像を重ね合わせた。図1に例を示す。非照射群の2分毎に撮影した像(図1-a)から、10分毎の像(図1-b, 上段)を重ね合わせると黒矢印の方向に細胞が移動することが観察できる(図1-b, 下段)。

6. Cdc42/Racの観察

レーザー照射30分後に、4%パラフォルムアルデヒド-PBSにて固定後、一次抗体としてRabbit anti-Cdc42/Rac polyclonal antibody(Stress-Gen Biotechnologies, USA)(PBSにて200倍希釈)を用い、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)(PCM 2000, Nikon, 東京)下にて観察を行った。

なお、レーザーを照射しないものを対照(非照射群)とし、Racの活性化因子であるlipopolysaccharide(LPS)¹³⁾を培地中に5 μg/ml添加したものを陽性対照(LPS群)とし、レーザー照射群(照射群)と比較検討した。

結 果

1. 細胞運動

細胞運動を位相差顕微鏡にて観察した結果、非照射群の細胞では、短紡錘形を呈し、細胞体の糸状仮足(フィロポディア, 図2, 矢印)および葉状仮足(ラメリポディア, 図2, 矢頭)が発達した方向に、観察時間を通し平均55μm/hrで移動していた(図3, 4)。LPS群は、細胞の形態および移動方向は非照射群と同様であったが、細胞の移動速度が速く、平均170μm/hrで移動していた(図3,

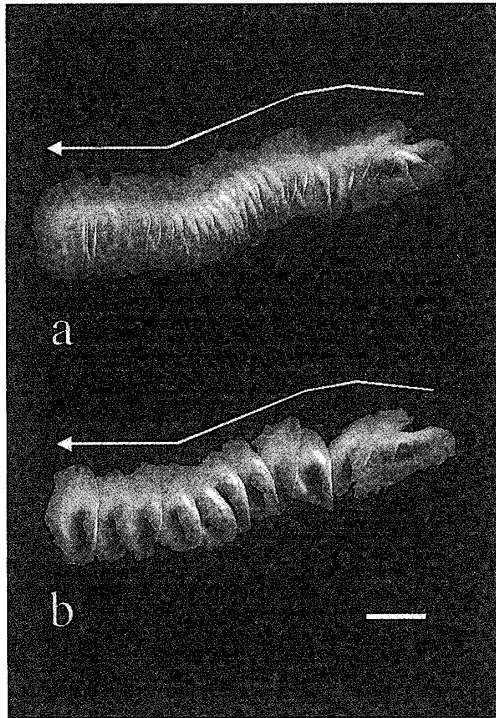


図4 非照射群
平均55 $\mu\text{m/hr}$ で移動する

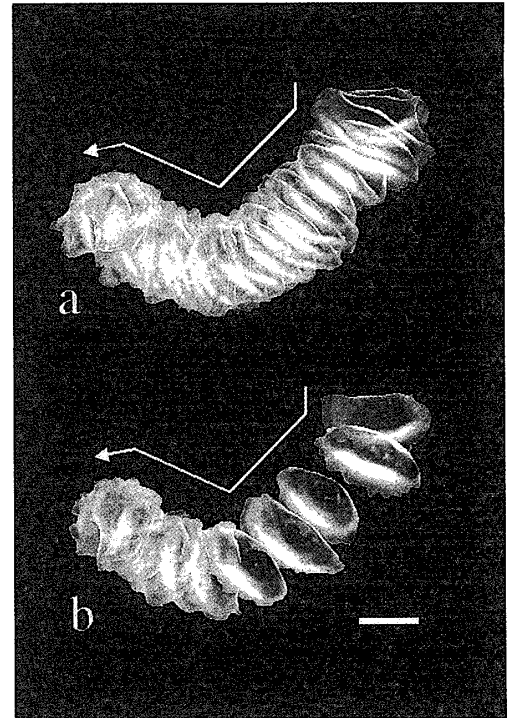


図6 照射群
30分後に90 $\mu\text{m/hr}$ とピークに達し、その後、速度が減少する

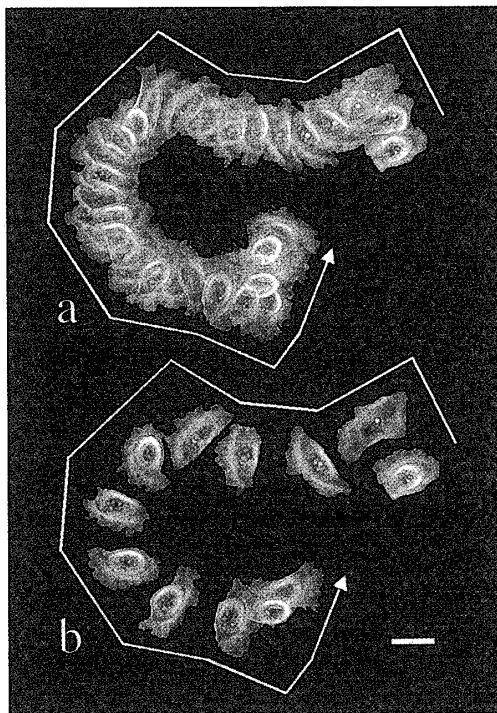


図5 LPS群
平均170 $\mu\text{m/hr}$ で移動する

図4～6 上皮細胞の細胞運動

a : 10分毎の重ね合わせ像, b : 30分毎の重ね合わせ像, 矢印: 細胞の移動方向, Bar=50 μm

5)。これに対し、照射群では、レーザー照射30分後、90 $\mu\text{m/hr}$ とピークに達し、その後、緩やかに速度が減少し、300分後には非照射群とほぼ同じ速度になった(図3, 6)。

2. Cdc42/Rac

Cdc42/RacについてCLSMにて観察した結果、非照射群の細胞は、細胞全体に弱い陽性反応が認められ、細胞の側にはやや強い反応が観察された(図7-a, 矢頭)。LPS群においては、細胞辺縁の運動性の高い膜、すなわち、ラメリポディアの膜に一致して強い反応が限局して認められた(図7-b, 矢頭)。

一方、照射群では、LPS群と同程度の強い反応が観察されたが、形態的にはラメリポディア全体に反応が認められた(図7-c, 矢頭)。

考 察

低出力レーザーの治癒促進効果に関する臨床報

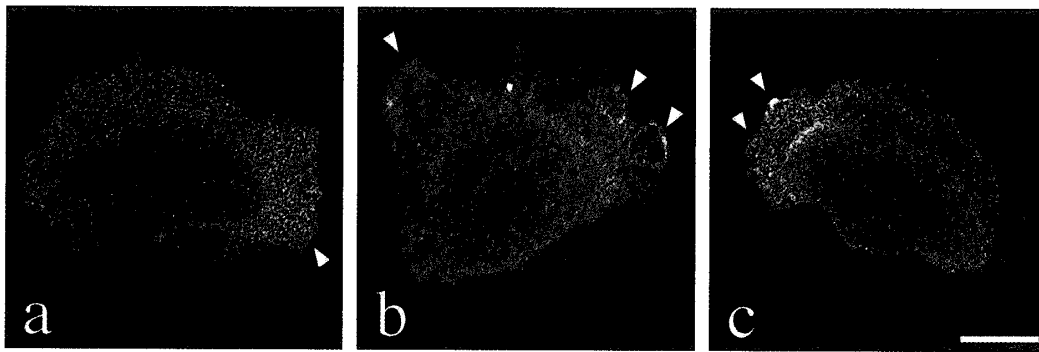


図7 Cdc42/RacのCLSM像

a : 非照射群, b : LPS群, c : 照射群, Bar=50 μ m

告^{3,4)}は数多く存在するものの、その作用機序については不明な点が多い。また、*in vitro*の実験においても、レーザーが細胞増殖を促進する、あるいは、コラーゲン合成を促進するなどといった報告にとどまり^{14,15)}、治癒の一連の過程を考慮した報告はほとんどない。治癒促進効果を解明するためには、細胞の増殖や分化のみならず、細胞の接着、移動、脱接着といった細胞運動のメカニズムを明らかにすることが重要である^{7,8)}。

そこで、治癒過程において重要な細胞運動への影響について、*in vitro*で生細胞の状態を検索した結果、照射群では一過性に細胞運動の活性化が観察された。接着している上皮細胞が脱接着して移動する際には、まず接着分子や受容体に連結しているアクチン細胞骨格が再編成されるとともに、接着分子や受容体がエンドサイトーシスされる。そして、移動する先端端では、フィロポディアが、次いでラメリポディアが形成され⁷⁾、さらに、後部では細胞が退縮する。また、インテグリンに依存したフォーカルコンタクトと、それに結合したアクチンストレスファイバーが再編成され、小胞輸送によってインテグリンが細胞の進行する方向へ運ばれることが知られている⁸⁾。

白井¹¹⁾は、歯肉由来上皮細胞を用い、低出力レーザーを照射し、細胞接着分子のインテグリンについて検索した。その結果、低出力レーザー照射によりインテグリンの発現に変化が生じ、さらに、細胞辺縁部のアクチンフィラメントの発達が認められたと報告している。また、高木¹⁶⁾は、骨系細胞における細胞骨格の形態変化を検索した結果、

レーザー照射により、ストレスファイバーが発達し、走行が変化すると報告している。このストレスファイバーは細胞運動に深く関与している^{17,18)}。つまり、照射群の細胞が一過性に細胞運動を活性化したという今回の結果は、白井、高木の報告と同様に、レーザー照射が上皮細胞の接着分子や細胞骨格に影響をおよぼしたために生じた現象であると考えられる。

一方、細胞運動に関連する因子のうち、近年、注目されているもののなかに、低分子Gタンパク質があげられる。低分子Gタンパク質はサブユニットを持たない20~25kDaのGTP結合タンパク質であり、Ras, Rho, Rab, Arf/Sar, Ranの5つのファミリーに分類されている。なかでも、Rhoファミリーはアクチン細胞骨格系の細胞機能を制御していることが知られており、さらに、Rhoファミリーにおいては、Rho, Rac, Cdc42のサブファミリーを構成する。Rhoはアクチンストレスファイバーやフォーカルコンタクトの形成を、Cdc42はフィロポディアを、Racはラメリポディアの形成を制御するとされている¹⁵⁾。

そこで、今回、レーザー照射により最も運動速度が速かった30分後について、形態的にCdc42/Racの発現を検索した。その結果、照射群では、細胞辺縁部の運動性の高いラメリポディアに一致して、LPS群と同程度の強い反応が認められ、非照射群より、Cdc42/Racの発現が明らかに強いことが確認された。細胞運動は、RhoファミリーのGタンパク質が、Cdc42→Rac→Rhoと順番に空間的特異的に活性化される必要があり、また、一

つのGタンパク質だけが強い活性をもつことは、運動にマイナスに働くとされている¹⁹⁾。今回、一過性の細胞運動の活性化が生じたのは、レーザーによりCdc42→Rac→Rhoと順番に活性化されたことによるものと推察する。

さらに、Rhoファミリーは細胞骨格系を調整するシグナル伝達機構ばかりではなく、細胞増殖や転写調節への関与も報告されている¹⁹⁾。Cdc42/Racは、そのエフェクターであるPAK(p21-activated kinase)^{12,19)}、MAP kinase(mitogen-activated protein kinase)を介してSAPK/JNK(stress-activated protein kinase, c-jun N-terminal kinase)を活性化し、c-junを活性化することが知られている¹⁹⁾。これまで我々は、レーザー照射により細胞内のセカンドメッセンジャーである細胞内フリーカルシウムイオンに変動が生じ、MAP kinaseの活性化が認められることを報告している¹⁰⁾。レーザー照射により歯肉上皮細胞の増殖が促進されること⁹⁾、Cdc42/Racの変化が認められることなどから、SAPK/JNKおよびc-junなどの活性化の可能性が考えられる。しかし、そのシグナル経路については、今後さらに検討する必要があるものと思われる。

以上、これまでの細胞増殖能およびコラーゲン合成能から検索した報告に加え、今回、細胞運動の面からアプローチし、低出力レーザー照射が、創傷治癒に関連する細胞運動を一過性に活性化することを明らかにした。

結 論

ヒト歯肉由来上皮細胞の細胞運動におよぼす低出力レーザーの影響について検索を行い、以下の結論を得た。

1. 低出力レーザー照射により、歯肉上皮細胞の細胞運動が一過性に活性化され、移動速度が増加した。

2. 低出力レーザー照射により、歯肉上皮細胞のCdc42/Racの発現が増強した。

これらの結果から、低出力レーザー照射は歯肉上皮細胞に対して、細胞運動と関連するRhoファミリーのシグナル伝達に影響をおよぼし、細胞運動を一過性に加速させることが明らかとなり、治

癒過程における細胞の動態の一部を解明することができた。

本研究は文部科学省科学研究費補助金(平成13, 14年度, 若手研究B, 課題番号13771079)の一部を使用した。

文 献

- 1) Trellas, M. A. and Mayayo, E. : Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med* **7**; 36-45 1987.
- 2) Anneroth, G., Hall, G., Ryden, H. and Zetterqvist, L. : The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* **26**; 12-17 1988.
- 3) 橋本賢二: 症例別レーザーの応用法 口腔外科領域への応用. *デンタルダイヤモンド* **20**; 45-49 1995.
- 4) 坂田篤信: 口内炎・口角炎・ヘルペスに対する処置. *デンタルダイヤモンド臨時増刊号 歯科用レーザーの最前線・各疾患への臨床応用*(松本光吉編) 第1版; 128-129 デンタルダイヤモンド社 東京 1999.
- 5) 上田 実: 粘膜の創傷治癒. *細胞* **22**; 182-186 1990.
- 6) Tamariz, E., Marsch-Moreno, M., Castro-Munozledo, F., Tsutsumi, V. *et al.* : Frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes enhance healing of full-thickness wounds in mice. *Cell Tissue Res* **296**; 575-585 1999.
- 7) 福原淳範, 入江賢児, 中西宏之, 高井義美: Rhoファミリー低分子量Gタンパク質による細胞の運動と接着の制御機構. *実験医学* **20**; 166-173 2002.
- 8) 彰 英峰, 萬代研二, 高井義美: 細胞の運動・接着における細胞骨格の再編成と小胞輸送. *細胞工学* **19**; 1008-1015 2000.
- 9) 土肥宏樹, 高木茂樹, 中川敏浩, 安部仁晴ほか: 低出力レーザー照射が培養細胞の増殖に及ぼす影響. *口腔組織培養研究会誌* **4**; 29-36 1994.
- 10) 土肥宏樹: ヒト歯肉上皮細胞に対する低出力レーザーの作用機序. *奥羽大歯学誌* **28**; 105-117 2001.
- 11) 白井龍一: ヒト歯肉細胞の細胞接着および細胞骨格におよぼすソフトレーザーの影響. *奥羽大歯学誌* **29**; 221-233 2002.
- 12) Kiosses, W. B., Daniels, R. H., Otey, C., Bokoch, G. M. *et al.* : A Role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J Cell Biol* **147**; 831-843 1999.
- 13) Woo, C. H. and Kim, J. H. : Rac GTPase activity is essential for lipopolysaccharide signaling

- to extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase activation in rat-2 fibroblasts. *Mol Cells* **13**; 470-475 2002.
- 14) 葛西真一, 山本康弘, 小谷裕美, 安藤修敏ほか：損傷・潰瘍の治療. *日レ医誌* **18**; 27-34 1997.
- 15) 守本祐司, 荒井恒憲：低出力レーザー生体作用の生物学的立場からの考察. *日レ医誌* **18**; 9-17 1997.
- 16) 高木茂樹：骨系細胞に対するソフトレーザーの効果. *奥羽大歯学誌* **22**; 280-287 1995.
- 17) 月田早智子：アクチンフィラメントと接着分子の相互作用. *実験医学* **10**; 1344-1350 1992.
- 18) 宮本新吾：FAKおよび細胞骨格分子による integrin シグナル伝達. *細胞工学* **16**; 833-839 1997.
- 19) 石崎敏理, 成宮 周：Rhoファミリーのシグナル伝達. *細胞工学* **16**; 840-849 1997.

著者への連絡先：土肥宏樹，(〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔解剖学第Ⅱ講座
 Reprint requests：Hiroki DOHI, Second Department of Oral Anatomy, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan