

Sunstar Young Investigator Award 口演

**インターロイキン1レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra)
のコラゲナーゼ3 (MMP-13) 発現抑制について**

愛知学院大学歯学部歯周病学講座

後藤 久嗣 先生

**Runx2 null iPS 細胞を用いた骨芽細胞分化機構における
Runx2非依存的経路の解析**

東京歯科大学歯周病学講座

青木 栄人 先生

歯根膜幹細胞培養上清は歯周組織再生を促進する

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科博士課程 (歯周病学分野)

永田 瑞 先生

歯根膜の老化性炎症における細胞老化の役割

大阪大学歯学研究科

池上久仁子 先生

**Wnt3a による歯小嚢分化誘導には Wnt/GSK3 β シグナル
非依存性経路が必要である**

東北大学病院歯周病科

向坂 幸彦 先生

座長 新潟大学 大学院医歯学総合研究科
摂食制御学講座 歯周診断・再建学分野

吉江 弘正 先生

平成28年10月7日 (金)

B会場 (4F マリンホール)

11:10~12:30

SYIA-01
2202

インターロイキン1レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) のコラゲナーゼ3 (MMP-13) 発現抑制について
後藤 久嗣

【目的】 Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) は Interleukin-1 (IL-1) の活性を調節する抗炎症性サイトカインとして知られている。これまでの研究において IL-1Ra ノックアウト (IL-1RaKO) マウスに A. a 菌を感染させ実験的歯周炎を惹起したところ、接合上皮に付着の喪失を伺わせる組織像が観察された。しかし、IL-1Ra が上皮性付着に与える影響については不明な点も多い。そこで、歯肉上皮細胞の IL-1Ra 遺伝子発現をノックダウンし、影響を受ける細胞外マトリックス遺伝子の検索を行った。また、実験的歯周炎を惹起させた IL-1RaKO マウスの歯周組織において、上皮性付着に関するタンパクの局在確認も検討した。【材料および方法】 ヒト歯肉上皮細胞 (Ca9-22) を用い、RNA 干渉による IL-1Ra 遺伝子発現ノックダウンを行った。候補となる細胞外マトリックス関連遺伝子の選択は PCR Array で検討した。IL-1Ra 遺伝子発現のノックダウンと選択された細胞外マトリックス関連遺伝子の経時的発現変動はリアルタイム PCR とウエスタンブロット法にて確認した。また、IL-1RaKO マウスに実験的歯周炎を惹起させ、接合上皮での選択された細胞外マトリックス関連遺伝子と上皮性付着に関するタンパクの局在を免疫染色にて検討した。【結果および考察】 control siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞群 (コントロール群) と比較し IL-1Ra siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞群 (ノックダウン群) において IL-1Ra 発現がノックダウン群において著明に低下していた。PCR Array の結果、コントロール群と比較しノックダウン群において、MMP (matrix metalloproteinase) -13 の最も高い発現増加を認めた。また、IL-1Ra KO マウスを用いた動物実験にて、接合上皮部における MMP-13 と上皮性付着の構成成分であるラミニン5の局在を調べた結果、IL-1Ra KO マウス群において、MMP-13の局在は多く確認されたが、ラミニン5の局在はほとんど確認されなかった。歯周組織において、IL-1Ra は MMP-13 の作用を抑制し上皮性付着の構成成分の破壊を阻止するという生体防衛的に重要な作用を示した。

SYIA-03
2504

歯根膜幹細胞培養上清は歯周組織再生を促進する

永田 瑞

【目的】 歯根膜幹細胞 (PDLSC) は歯根膜から単離、培養される間葉系幹細胞 (MSC) である。我々は PDLSC の移植によって歯周組織が再生することを報告してきたが、同時に移植した細胞の生着が少ないことも観察した。そこで、PDLSC 移植による組織再生は移植細胞から放出されるパラクリン因子によるものではないかと仮説を立てた。本研究の目的は、PDLSC 由来パラクリン因子を含む培養上清 (PDLSC-CM) の移植による歯周組織再生について、動物モデルを用いて検討することである。

【材料と方法】 健全抜去歯より PDLSC を培養した。培養上清は無血清 DMEM にて 48 時間培養した上清を回収し、限外濾過にて濃縮した。対象群として無細胞で培養した Control-CM、皮膚線維芽細胞培養上清 (Fibroblast-CM) を作製した。ラット下顎第一臼歯頰側に外科的歯周組織欠損を作製し上清 (CM) をコラーゲンスポンジに含浸し移植した。術後 5 日目に欠損内の組織を回収し RT-PCR を用いて遺伝子発現解析を行い、28 日目に下顎ブロックを回収し μ CT 撮影および組織学的観察を行った。CM 中のタンパク質は protein array を用いて網羅的に解析した。

【結果と考察】 μ CT 像において、PDLSC-CM 移植は Control-CM、Fibroblast-CM と比較して有意な歯槽骨再生を示した。また、PDLSC-CM は Control-CM と比較して歯周組織局所における TNF- α の遺伝子発現を抑制した。Protein array の結果より、PDLSC-CM が多種の血管新生因子、増殖因子、サイトカインを含む事が明らかとなった。さらに PDLSC-CM の濃縮倍率を検討したところ、30 倍および 450 倍濃縮の CM 移植において有意な歯周組織再生を認めた。組織学的評価では再生組織は新生セメント質・骨・歯根膜による正常な歯周組織である事が確認された。

【結論】 歯根膜幹細胞培養上清の移植は歯周組織再生を促進し、新たな歯周組織再生法となる可能性が示唆された。

SYIA-02
2206

Runx2 null iPS 細胞を用いた骨芽細胞分化機構における Runx2 非依存的経路の解析

青木 栄人

【目的】 現在、歯周組織再生療法においては、十分な量の歯槽骨の再生を含めた予知性の高い歯周組織再生が課題となっている。Runx2 は骨芽細胞分化に必須の遺伝子であるが、骨分化過程における作用については未だ明らかにされていない点が多い。そこで今回、Runx2 ホモ欠損マウス由来 iPS 細胞を作成し、骨芽細胞分化における Runx2 非依存的経路の解明を目的に研究を行った。

【材料および方法】 Runx2 ヘテロ欠損マウス (C57BL/6) の交配により得られた胎児より、マウス胚線維芽細胞 (MEF) を作成後、Runx2 null, hetero, wild の 3 群に分け、iPS 細胞の作成を行った。未分化マーカーおよびテラトーマの作成を行い、iPS 細胞の樹立を確認した。各 iPS 細胞は骨芽細胞分化誘導培地にて培養した後、2, 3 週で ALP 染色、フォンコッサ染色ならびに分化マーカーの解析を行った。また、分化時期を代表する ALP や BSP, OCN の発現上昇時期において、マイクロアレイ及び次世代シーケンサーを用いた RNAseq を行い、網羅的解析による Runx2 及び、その関連遺伝子群の発現を検討した。

【結果および考察】 作成した iPS 細胞は 3 群ともに形態および増殖能に明確な相違は認められなかった。分化誘導 2 週において 3 群ともに ALP 活性を認め、real-time PCR の結果より分化マーカーの明確な相違がないことから、分化の初期においては Runx2 非依存的な経路が存在することが示唆された。骨芽細胞分化過程における Runx2 の発現は、Dlx3/5, Msx2 などにより精緻に調節されている可能性が示唆された。

SYIA-04
2504

歯根膜の老化性炎症における細胞老化の役割

池上 久仁子

【目的】 加齢は、喫煙と並ぶ歯周病の重要なリスクファクターである。加齢の過程で曝露される細菌感染や外傷性咬合などの環境ストレスは、DNA ダメージを誘導することで、歯周組織に対する老化刺激になるものと考えられる。本研究においては、*in vivo* マウスモデルにおける歯周組織の加齢性変化と老化細胞の局在について検討するとともに、*in vitro* でのヒト歯根膜細胞の複製老化誘導モデルを用いて、老化歯根膜細胞の老化形質発現機構並びにその病態生理学的作用について検討した。

【材料及び方法】 60 週齢の C57BL/6 マウスの上顎歯槽骨をマイクロ CT にて計測、解析するとともに、歯周組織における老化細胞マーカーである SA-beta Gal とニコチンアミド依存性脱アセチル化酵素、SIRT1 の発現を免疫組織染色法により検討した。*in vitro* において初代ヒト歯根膜細胞 (HPDL) の継代培養により複製老化を誘導し、老化 HPDL を樹立した。樹立された老化 HPDL について脱アセチル化阻害処理を行い、RNA ならびにタンパク画分を回収し、炎症性サイトカイン、ECM タンパクの発現機構について、遺伝子の転写、タンパク翻訳レベルで解析した。

【結果と考察】 高週齢マウスは顕著な歯槽骨吸収を認め、歯根膜に SA-beta Gal 陽性細胞の発現を認めた。老化 HPDL は、SIRT1 依存的なアセチル化制御により炎症性サイトカイン産生を調節することが示唆された。エピジェネティックな変異が蓄積した老化細胞が産生するサイトカインや ECM タンパクの異常が、慢性炎症を惹起し、高齢者における歯周病の重篤化に関与することが示唆された。

SYIA-05

2504

Wnt3aによる歯小囊分化誘導にはWnt/GSK3 β シグナル非依存性経路が必要である

向坂 幸彦

キーワード：歯小囊細胞, Wntシグナル, 細胞分化, p38/MAPキナーゼ

【目的】 Wnt3aはLPR5/6受容体を介してGSK3 β / β -cateninシグナル経路を活性化する分子で、歯周組織の形成および恒常性の維持に加え、セメント質の形成に関与していることが明らかとなってきた。我々は、セメント芽細胞の前駆細胞と考えられている歯小囊細胞がWnt3a刺激により、転写因子Osterixの発現誘導を介してアルカリホスファターゼの発現を誘導されることを報告した(J.Periodont.Res.in press)。本研究は、マウス歯小囊細胞を用いてWnt3aによるOsterix発現誘導の分子メカニズムについて解析を行った。

【材料および方法】 マウス歯小囊細胞株をリコンビナントWnt3a存在下で培養し、以下の方法にて解析した。1) 細胞内シグナル分子のリン酸化解析：ウェスタンブロット法, 2) 遺伝子発現：定量リアルタイムPCR法, 3) Wnt/ β -catenin転写活性：TOPflashプラスミドを用いたレポーターアッセイ法

【結果および考察】 p38/MAPK阻害剤前処理は、Wnt3a刺激によるGSK3 β および β -cateninのリン酸化に作用しなかったが、 β -cateninの転写活性誘導およびOsterixの発現誘導を抑制した。Wnt3aアンタゴニストDickkopf-1によるLPR5/6受容体シグナルの遮断は、Wnt3a刺激によるp38/MAPKのリン酸化に作用しなかった。これらの結果より、Wnt3aによるOsterixの発現誘導には、LPR5/6 \sim β -cateninシグナル経路とは別経路で活性化されるp38/MAPKシグナルが必要であることが示唆された。本機構は過去に報告がない経路であり、この別経路の解明は歯周組織再生理論の基盤構造に貢献できるものと考えられる。

