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/GSK3β 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-l）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御的に重要な作用を示した。

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などにより精微に調節されている可能性が示唆された。

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ライ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由来パラクライ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頬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μCT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】μCT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-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。エピジェネティクな変異が集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による歯小嚢分化誘導にはWnt/GSK3β 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：歯小嚢細胞，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GSK3β/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嚢細胞が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，マウス歯小嚢細胞を用いて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】マウス歯小嚢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：定量性リアルタイム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GSK3β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～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。