

マウス顎下腺上皮細胞の細胞外液性因子が iPS 細胞に与える影響

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御学専攻病態機構学講座 歯周病態学分野¹
岡山大学病院 歯周科²

○池田淳史¹, 峯柴淳二², 山口知子¹, 峯柴史¹, 前田博史¹, 高柴正悟¹

Effect of Environmental Factors of Mouse Submandibular Gland Cells on Mouse iPS cells

¹Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science

²Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital

○IKEDA Atsushi¹, MINESHIBA Junji², YAMAGUCHI Tomoko¹, MINESHIBA Fumi¹,
MAEDA Hiroshi¹, TAKASHIBA Shogo¹

【目的】

唾液は、口腔内を湿潤状態に保つことで口腔感染症の発生を抑制し、口腔環境を保つ重要な働きを担っている。しかし、唾液腺は通常自己再生能を持たず、一度障害を受けると機能回復は難しい。近年、唾液腺上皮細胞の中で CD49f を発現している細胞は、内胚葉系の多臓器の細胞へと分化する能力を持つことが報告されている (Okumura *et al.*, *Hepatology*, 2003)。また再生医療の分野では、ES 細胞と同程度の多能性を有する誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) が注目を浴びている。さらに、組織幹細胞周囲の微小環境からのシグナルによる制御が組織の修復に重要であることが報告されている (Scadden, *Nature*, 2006)。そこで我々は唾液腺前駆細胞の可能性のある CD49f 陽性マウス顎下腺上皮細胞 (CD49f⁺細胞) とマウス iPS 細胞の共培養による微少環境を作り、分化のメカニズムを解明することが可能であると考えた。本研究では、CD49f⁺細胞の細胞外液性因子がマウス iPS 細胞へ与える影響を調べることを目的とした。

【材料および方法】

1. マウス iPS 細胞の内胚葉系細胞への分化：マウス胚線維芽細胞をフィーダー細胞として iPS 細胞 (理化学研究所バイオリソースセンター) を継代・培養後、基礎培地として Advanced Roswell Park Memorial Institute (A-RPMI) を用いて、ウシ胎児血清 (FBS), Wntless-type 3A (WNT3A), Activin A, Fibroblast growth factor 10 (FGF10), あるいは KAAD-cyclopamine (KAAD-CYC) を添加し作製した Mesendoderm (ME) 培地, Definitive endoderm (DE) 培地, あるいは Posterior gut tube endoderm (PG) 培地で培養し分化させた。添加するタンパク因子を段階希釈し、その濃度と培養日数を変化させた。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法で各分化段階に発現する分化指標因子の mRNA の発現を確認し、分化状態を比較検討した。
2. CD49f⁺細胞の細胞外液性因子のマウス iPS 細胞へ与える影響：マウス顎下腺を摘出後、単一の細胞へ分離し、磁気ビーズ法を用いて CD49f⁺細胞を分離した。上述の分化用培地で培養した各分化段階の iPS 細胞と CD49f⁺細胞をトランスウェル内で共培養を行い、唾液腺関連因子を含む上皮系細胞に高発現するタンパク因子の mRNA 量を定量 RT-PCR 法を用いて比較検討した。

【結果】

1. 基礎培地に添加するタンパク因子の種類と濃度、そして分化培地での培養日数の適切な組合せを決定した。
 - ①基礎培地 + 12.5 ng/ml WNT3A + 50 ng/ml Activin A (ME 培地) で 1 日
 - ②基礎培地 + 0.2% FBS + 50 ng/ml Activin A (DE 培地) で 1 日
 - ③基礎培地 + 2% FBS + 25 ng/ml FGF10 + 0.125 μM KAAD-CYC (PG 培地) で 2 日
2. CD49f⁺細胞を種々に分化した iPS 細胞と共培養を行うと、PG に分化した iPS 細胞において、非角化扁平上皮細胞と増殖期の扁平上皮細胞に発現する Cytokeratin 6a の mRNA 発現量は増加した。さらに、腺房・導管細胞に発現する Claudin 3 の mRNA は CD49f⁺細胞と共培養していない対照と比較すると発現量を維持した。しかし、ME と DE に分化した iPS 細胞では、CD49f⁺細胞と共培養していない対照と比較して変化がなかった。

【結論と考察】

以上の結果から、唾液線由来の CD49f⁺細胞の細胞外液性因子は、PG に分化した iPS 細胞を唾液腺上皮細胞へと分化誘導できる可能性がある。しかし、本研究は細胞間の接触による相互作用の影響を考慮しておらず、それを加味することができれば、唾液腺上皮細胞様細胞にもっと近い性質を持つ細胞へと分化が可能であると考えられる。

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科動物実験承認番号：OKU-2011559)

マウス iPS 細胞の低酸素下培養における HIF (Hypoxia Inducible Factor) の役割
Function of HIF(Hypoxia Inducible Factor) in hypoxic cultivation of mouse iPS cells

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 齶蝕学分野

○杉本 浩司、吉澤 祐、石崎 秀隆、林 善彦

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

○Sugimoto Koji, Yuu Yoshizawa, Ishizaki Hidetaka, Hayashi Yoshihiko

[研究目的]

近年、医学領域では心筋細胞の再生などの臨床研究も進んでいるが、歯科領域においても幹細胞を応用し失われた歯の再生療法が注目されている。

我々の教室では4因子と3因子導入マウス iPS 細胞を用いた低酸素培養下での増殖・分化、骨芽細胞誘導時における影響について検討し、低酸素培養(5%O₂)では通常培養(20%O₂)より未分化状態を維持していることがわかった。

低酸素環境下で、幹細胞や ES 細胞は HIF(hypoxia inducible factor)の働きにより未分化状態が維持されていることが報告されており、iPS 細胞でも HIF の働きによることが推察される。本研究では低酸素環境下での HIF の働きについて検討した。

[材料および方法]

実験には理研 CELL BANK より購入したマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-178B-5)を用いた。MEF を播種した Dish 上に、マウス iPS 細胞を5日間 FBS、2-Mercaptoethanol、NEAA、mouseLIF、penicillin/streptomycin、bFGF 添加 DMEM で培養。継代時に siRNA をトランスフェクションした3因子導入マウス iPS 細胞を60mmDish 上に1.0×10⁵ cell/cm²の密度で播種し、5%O₂下で48時間培養した。それぞれの Dish には50nM siRNAs {Product Names: Mm_Hif1a_4FlexiTube siRNA, Mm_Epas1 (Hif2a)_5FlexiTube siRNA, Mm_Hif3a_5FlexiTube siRNA, QIAGEN} に HiPerfect transfection reagent (QIAGEN)を添加しており、siRNA 導入48時間後に細胞を回収し、細胞形態、Nanog, Sox2, Oct4 の mRNA 発現量を比較した。対照群は、AllStars Negative Controls (QIAGEN) をトランスフェクションしたものをを用いた。

[結果]

siRNA を導入し、HIFs をノックダウンしたときの iPS 細胞のコロニーの形態学的観察を行った。HIF1a をノックダウンしたものでは、対照群と同様に iPS 細胞のコロニーを形成した。しかし、HIF2a をノックダウンしたものでは、コロニーは形成するもののコロニーサイズが減少していた。HIF3a をノックダウンしたものでは、HIF1a をノックダウンしたときと同様に、対照群と同じように iPS 細胞のコロニーを形成した。

HIF1a をノックダウンしたものでは、未分化マーカーである Nanog, Sox2, Oct4 の発現量は対照群と有意差はなかった。HIF2a をノックダウンしたものでは、対照群と比較して、Nanog, Sox2, Oct4 の発現量は有意に減少していた。また、HIF3a をノックダウンしたのも、対照群と比較して、Nanog, Sox2, Oct4 の発現量は有意に減少していた。

[まとめ]

今回の結果から、iPS 細胞の低酸素環境下では、HIF(hypoxia inducible factor)の働きにより未分化状態が維持されていることが推察される。特に、コロニー形成に関しては、HIF2a の関与が明確となった。未分化マーカーの発現に関しては、HIF2a, HIF3a の働き、特に HIF2a によって iPS 細胞の多能性が調節されていると考えられる。

Toll-Like Receptor 4 発現における *TLR4* 遺伝子 3' 側非翻訳領域の 一塩基多型 rs11536889 の役割

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病学分野¹, 日本大学松戸歯学部 歯周治療学講座²

○佐藤佳昌¹, 吉村篤利¹, 金子高士¹, 岸本隆明¹, 松村浩禎², 小方頼昌², 原 宜興¹

Role of a Single Nucleotide Polymorphism rs11536889 at 3' -UTR of *TLR4* Gene in Toll-Like Receptor 4 Expression

Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences¹,

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo²

○Kayo Sato¹, Atsutoshi Yoshimura¹, Takashi Kaneko¹, Takaaki Kishimoto¹, Hiroyoshi Matsumura²,
Yorimasa Ogata², Yoshitaka Hara¹

【目的】

我々は、*TLR4* 遺伝子における一塩基多型 (SNP) rs11536889 のマイナーアレルホモ接合 C/C の頻度は歯周病患者に多く、さらに重度患者に多いことを報告した。rs11536889 は *TLR4* 遺伝子の 3' 側非翻訳領域 (3' -UTR) に存在することから、Toll-Like Receptor (TLR4) 発現量の調節に関与していることが予想された。本研究では、この SNP が *TLR4* の転写および翻訳に与える影響について解析した。

【材料および方法】

1. rs11536889 における遺伝子型 C/C および G/C、G/G の被験者 (それぞれ C/C、G/C、G/G 群) 各 12 名から末梢血を採取し、単球膜表面における *TLR4* 発現量をフローサイトメトリー法で比較した。また、対照として、*TLR2* 発現量についても同様な方法で比較した。
2. C/C および G/C、G/G 群各 19 名の単核球を *TLR4* リガンドであるリポ多糖 (LPS) 1 ng/ml または *TLR2* リガンドである合成リポペプチド Pam₃CSK₄ 100 ng/ml で 20 時間刺激し、上清中のサイトカイン産生量を ELISA 法で測定した。
3. C/C および G/C、G/G 群各 18~19 名の単核球における *TLR4*mRNA の発現量を定量的 PCR (real-time PCR) を用いて比較した。
4. G/G および C/C 群各 4 名の単核球を Pam₃CSK₄ 100 ng/ml で刺激し、*TLR4*mRNA と *TLR4* 蛋白の発現量の経時的変化を、それぞれ real-time PCR とフローサイトメトリー法で解析した。
5. ルシフェラーゼ遺伝子上流に *TLR4* 遺伝子のプロモーター領域を、下流に G アレルまたは C アレルの rs11536889 を含む 3' -UTR 断片を挿入したコンストラクトを作製し、THP-1 細胞に発現させた。この細胞を LPS 1 μg/ml で刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【結果】

1. C/C 群の単球は、G/G および G/C 群の単球よりも細胞膜表面における *TLR4* 発現量は多かった。TLR2 発現量については、各遺伝子型群間での違いは認められなかった。
2. C/C および G/C 群の単核球における LPS 刺激後の IL-8 産生量は、G/G 群よりも多かった。また、IL-6 および TNF-α の産生量も C/C 群で高い傾向がみられた。Pam₃CSK₄ で刺激後のこれらのサイトカイン産生量に各遺伝子型群間での違いは認められなかった。
3. 末梢血単核球における *TLR4*mRNA の発現量に各遺伝子型群間での違いは認められなかった。
4. 単核球を Pam₃CSK₄ で刺激すると、G/G、C/C 群ともに *TLR4*mRNA の発現量は増加したが、*TLR4* 蛋白の発現は C/C 群においてのみ増加し、G/G 群では増加しなかった。
5. rs11536889 における G アレルの *TLR4* 遺伝子 3' -UTR 断片をルシフェラーゼ遺伝子下流に挿入すると、THP-1 細胞におけるルシフェラーゼ活性が抑制されたが、C アレルの断片では抑制されなかった。

【考察および結論】

rs11536889 における遺伝子多型の C アレルは *TLR4* 遺伝子の翻訳を抑制することで *TLR4* の発現量を調節し、LPS 応答性に影響を及ぼしていることが示唆された。

TNF- α と IL-4 刺激が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL11 産生に及ぼす緑茶カテキンの影響

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯科保存学分野 ²⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔微生物学分野 日本学術振興会特別研究員 PD ³⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野

○ 細川義隆¹⁾、細川育子²⁾、尾崎和美³⁾、中西正¹⁾、中江英明¹⁾、松尾敬志¹⁾

The effect of catechin on CCL11 production from TNF- α and IL-4-stimulated human gingival fibroblasts

¹⁾Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School, ²⁾Department of Oral Microbiology, The University of Tokushima Graduate School, JSPS Research Fellow ³⁾Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School

○Yoshitaka Hosokawa¹⁾, Ikuko Hosokawa^{1) 2)}, Kazumi Ozaki³⁾, Tadashi Nakanishi¹⁾, Hideaki Nakae¹⁾ Takashi Matsuo¹⁾

【研究目的】

CC chemokine ligand 11 (CCL11)はCC chemokineに属するケモカインであり、CC chemokine receptor 3 (CCR3)を介してTh2細胞浸潤に関与している事が明らかとなっている。近年、Th2細胞が歯周炎のマウスモデルにおいて歯槽骨吸収に関与している事が報告され注目されている (J Immunol. 187, 501-509, 2011)。また、catechinは緑茶に多く含まれるポリフェノールであり、抗酸化作用、抗癌作用、抗炎症作用などがあることが報告されているが、CCL11産生に与える影響に関しては報告がなく不明な点が多い。本研究では、炎症性サイトカインであるTNF- α とTh2サイトカインであるIL-4がヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) のCCL11産生に与える影響ならびにcatechinがTNF- α およびIL-4刺激HGFsのCCL11産生に与える影響に関して検討を行った。

【材料および方法】

HGFsは智歯抜歯時に正常歯肉組織よりout growth法により分離し、10%FBSを含むDMEM培地にて培養し実験に用いた。まず、HGFsをTNF- α およびIL-4で刺激しCCL11産生をELISA法により解析した。さらにcatechinの主な成分であるEpigallocatechin gallate (EGCG)にてHGFsを1時間前処理後TNF- α とIL-4刺激を行い、CCL11産生をELISA法にて、細胞内シグナル伝達分子 (MAPKs) のリン酸化をwestern blot法にて解析を行った。また、TNF- α とIL-4誘導CCL11産生に関与するシグナル伝達経路を解明するためにシグナル伝達阻害物質にて前処理後、TNF- α とIL-4刺激を行いCCL11産生を確認した。

【成績】

HGFsはTNF- α とIL-4単独刺激でもCCL11を産生したが、TNF- α とIL-4の共刺激において単独刺激と比較し相乗的にHGFsのCCL11産生が誘導された。EGCGはTNF- α とIL-4が誘導したCCL11産生を濃度依存的に抑制した。また、p38 MAPK inhibitor, ERK inhibitor およびJNK inhibitorは有意にTNF- α とIL-4が誘導したCCL11産生を抑制した。さらに、TNF- α とIL-4刺激が誘導したERKならびにJNKのリン酸化をEGCGは抑制した。

【考察および結論】

今回の結果より、TNF- α とIL-4刺激によりCCL11産生がHGFsに誘導されることより、歯周炎病変局所へのTh2細胞浸潤にHGFsは積極的に関与している事が示唆された。また、EGCGはTNF- α とIL-4刺激HGFsのERKとJNKを介したシグナル伝達経路を抑制することにより、HGFsのCCL11産生を減少させる事が示された。この結果より、緑茶カテキンは歯周炎においてTh2ケモカインであるCCL11産生を抑制する事により、Th2細胞の歯周炎病変局所への浸潤・集積を減少させ、歯周炎の進行を抑制できる可能性が示唆された。

ヒト歯肉線維芽細胞におけるカベオリン-1 を標的とした IL-6 誘導性のリソソーム酵素カテプシン B と L 分泌の抑制制御

¹⁾岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野, ²⁾岩手医科大学歯学部 口腔機能保存学講座
○後藤絢香¹, 山口知子¹, 大森一弘¹, 小林寛也¹, 成石浩司², 前田博史¹, 高柴正悟¹

Inhibitory effects of IL-6/sIL-6R-induced cathepsin-B, -L secretion by targeting caveolin-1 in human gingival fibroblasts

¹Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of
Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Science, Okayama, Japan,

²Department of Conservative Dentistry and Oral Rehabilitation, Division of Endodontology,
Iwate Medical University, Iwate, Japan

○GOTO Ayaka¹, YAMAGUCHI Tomoko¹, OMORI Kazuhiro¹, KOBAYASHI Hiroya¹,
NARUISHI Koji², MAEDA Hiroshi¹, TAKASHIBA Shogo¹

【諸言】

歯周病は結合組織が破壊される慢性炎症性疾患であり、組織内ではインターロイキン 6 (IL-6) などの炎症性サイトカインが多様に作用し合っている。カテプシンは主にリソソーム内で作用する酵素であるが、これは前駆体型として細胞外へ分泌され、細胞外基質の分解にも関与していることが知られている。これまで我々は、IL-6 がカベオリン-1 (Cav-1) および c-Jun N-terminal kinase (JNK) を介してヒト歯肉線維芽細胞内のカテプシン B と L 活性を亢進することを報告してきた (Yamaguchi *et al.*, *J Cell Physiol*, 2008)。さらに我々は、IL-6 がカテプシン分泌を亢進するという知見を得ていることから、その亢進においても Cav-1 が関与していると考えた。本研究では、ヒト歯肉線維芽細胞における IL-6 誘導性カテプシン B と L 分泌への Cav-1 の関与およびその刺激伝達系を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

1. ヒト歯肉線維芽細胞の培養：細胞は、臨床的に健康なヒト歯肉から分離・培養した線維芽細胞様細胞を、ヒト歯肉線維芽細胞として用いた。培養は、ウシ胎児血清を 10% の割合に含む DMEM (Invitrogen) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下、95% 湿潤下で行った。なお、5 - 8 代継代培養した細胞を実験に用いた。(倫理委員会承認：No. 661)
2. Cav-1 発現抑制細胞の樹立：Cav-1 の発現を抑制した細胞は、通法に従って Cav-1 を標的とする small interfering RNA (siRNA：100 nM, Santa Cruz) を細胞に導入して樹立した。なお、Cav-1 の発現抑制は、遺伝子導入した 24 時間毎に細胞の全細胞蛋白を回収し、ウエスタンブロット法によって Cav-1 の発現量を調べ、確認した。
3. 細胞の IL-6 による刺激：上記 1 と 2 のヒト歯肉線維芽細胞を、ヒトの組み換え型 IL-6 および可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) (ともに R&D, 50 ng/ml) で刺激した。そして、24 時間毎に培養上清と細胞質を回収した。
4. mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系の抑制：p44/42 MAPK および c-Jun N-terminal kinase (JNK) は、阻害剤である PD98059 および SP600125 (各 50 μM) を、IL-6/sIL-6R 添加の 30 分前に、添加して抑制した。
5. IL-6 誘導性カテプシン B と L の検出：前駆体型と成熟型の総カテプシンの B と L は、抗カテプシン B あるいは L 抗体を一次抗体としたウエスタンブロット法によって検出した。各バンドのシグナルは、内部コントロールである Lamp-1 および総蛋白量を対照として相対黒化度を測定し、比較した。
6. 統計解析：ANOVA / Sheffe's test を用いて検定し、P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. IL-6/sIL-6R で刺激すると、総カテプシン B と L の細胞内の蓄積量および培養上清への分泌量が増加した (p<0.05)。
2. Cav-1 の発現を抑制すると、総カテプシン B と L の蓄積量と分泌量が減少した (p<0.05)。
3. p44/42 MAPK を阻害すると、総カテプシン B と L の蓄積量は減少せず、総カテプシン B の分泌量のみ減少した (p<0.05)。JNK を阻害すると、総カテプシン B と L の両方の蓄積量および分泌量が減少した (p<0.05)。

【考察および結論】

ヒト歯肉線維芽細胞における IL-6 誘導性カテプシン B と L の産生には Cav-1 が関与しており、総カテプシン B と L の細胞内蓄積における刺激伝達系にはこれまでの報告と同様に JNK が、分泌には JNK のみならず p44/42MAPK も関与していることが明らかとなった。このことは、IL-6 がもたらす結合組織での炎症メカニズムの解明につながることに、将来の Cav-1 を標的とした IL-6 による歯周病悪化を抑制制御し得る可能性を示唆する。

誘電体バリア放電低温大気圧マイクロプラズマ照射がヒト歯肉線維芽細胞に与える影響

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座
○高橋亮一, 沼部幸博

The influence that dielectric barrier electric discharge low temperature atmospheric pressure microplasma irradiation gives to a human gingival fibroblast

Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Tokyo, Nippon Dental University

○Ryoichi Takahashi, Yukihiro Numabe

【背景および目的】

プラズマ技術は半導体や物質表面の改質などの工業分野や血液凝固や滅菌処理などの医療分野など様々な分野で応用されている。技術の発展に伴い、安定的に微小ギャップ間でのマイクロプラズマを生成できるようになった。マイクロプラズマの大きな特徴の一つとしては大気圧下で低温度、低電圧で微小な規模のプラズマを生成できる点がある。近年の研究ではヒトの皮膚潰瘍にプラズマ照射をする事で創傷治癒を促進させた報告や、細胞へ照射する事で代謝活性が上昇した報告があり、細胞や組織などの生体を対象にプラズマ照射がもたらす影響の分析が行われている。しかしながらマイクロプラズマ照射における研究報告は少なく、細胞レベルでの基礎的な研究においてはわずかしき報告がない。

今回、誘電体バリア放電低温大気圧マイクロプラズマ発生装置を用いてプラズマ照射後のヒト歯肉線維芽細胞に対する影響について分析し、新たな知見を得たので報告する。

【材料と方法】

株化されたヒト歯肉線維芽細胞(株式会社DSファーマバイオメディカル, 以下 Gin-1 と省略)を用いた。マイクロプラズマ発生装置は静岡大学イノベーション共同研究センターおよびパルステック工業社の共同開発したものでパルス波を電源として電極に誘導体バリア材料を使用した誘電体バリア放電低温大気圧マイクロプラズマ発生装置を用いた。

実験では Gin-1 を 500cells/well に調整後、96well plate に播種し 24 時間培養後、マイクロプラズマ照射を行った。照射条件はパルス周期 40 μ s、パルス幅 1.0 μ s、照射距離 10mm、気体流量 10L/min、照射時間は 10、30、60、90 秒とし 1 日 1 回の照射を 7 日間行った。電圧は 600 v ~ 950 v の範囲内の様々な電圧条件で培養細胞へマイクロプラズマ照射を行った。

細胞の評価として細胞増殖比を分析した。マイクロプラズマ照射後の経時的な細胞増殖数の測定として、MTT 改良法 (WST-8) を用いて 7 日間の細胞増殖数を測定した。

【結果および考察】

誘電体バリア放電低温大気圧マイクロプラズマを電圧 600V の低出力で Gin-1 に照射したものは作用させていないものと比較して統計学的有意に細胞増殖を認めた (P < 0.01)。この結果はマイクロプラズマの発生により生成された各種ラジカルが、細胞に対して刺激を与えることが活性化に関与している事が推測された。今後は細胞増殖活性に関連する代謝経路や遺伝子レベルでの細胞活性の分析、また影響を与えたラジカルの分析など更なる追加実験が必要と考えられる。

【参考文献】

パルス駆動大気圧マイクロプラズマの特性とその応用 Introduction and application of pulse driven atmospheric microplasma. 清水一男. 電気学会研究会資料パルスパワー/放電合同研究会, PPT-11-049, ED-11-097, pp. 43-50, 2011.

【会員外研究協力者】 静岡大学イノベーション共同研究センター 清水一男

Aggregatibacter actinomycetemcomitans の outer membrane protein-29 はヒト歯肉上皮細胞において smad2 を介してアポトーシスシグナルを誘導し、E-cadherin の発現を減少させる

広島大学大学院医歯薬総合研究科 先進医療開発科学講座歯周病態学分野

○吉本 哲也 藤田 剛 應原 一久 内田 雄士 松田 真司 宮川 剛史 今井 遙香 柴 秀樹 河口 浩之
栗原 英見

Outer membrane protein-29 from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces apoptosis and decrease the expression of E-cadherin in human gingival epithelial cells
Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University
Graduate School of Biomedical Sciences

○Tetsuya Yoshimoto, Tsuyoshi Fujita, Kazuhisa Ouhara, Yuushi Uchida, Shinji Matsuda, Tsuyoshi Miyagawa, Haruka Imai, Hideki Shiba, Hiroyuki Kawaguchi, Hidemi Kurihara

【目的】

歯肉上皮細胞は細菌の侵入に対して物理的バリアーとして機能する一方、炎症性サイトカインを産生するなど歯周病の発症、進行に深く関与すると考えられる。細胞間接着は上皮細胞の機能を制御する重要な因子であり、歯肉接合上皮においては E-cadherin を始めとする細胞間接着因子の存在が知られている。歯周病に罹患した接合上皮では、E-cadherin の発現が低下している。E-cadherin 発現の調節には、caspase を介したアポトーシスシグナルの関与が種々の細胞で報告されている。歯周病原細菌刺激によって引き起こされるアポトーシスシグナルを介した上皮細胞間接着破壊のメカニズムを解明することは、歯周病の発症機序の解明につながると考えられる。そこで本研究では、ヒト歯肉上皮細胞培養系を用い、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.actinomycetemcomitans*) の 29 kDa 外膜タンパクである outer membrane protein-29 (omp-29) 存在下におけるアポトーシス関連タンパク質の発現、及び E-cadherin の発現について検討した。

【材料と方法】

不死化したヒト歯肉上皮細胞 OBA9 (大阪大学, 村上伸也教授より供与) を実験に使用した。Hu-mediaKB2 に insulin, human epidermal growth factor, gentamicin, amphotericin, hydrocortisone hemisuccinate を添加した培地を用いて、OBA9 をサブコンフルエントになるまで培養し、omp-29(1 µg/ml) を 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 48 時間作用させた後、細胞を SDS buffer で溶解しサンプルをとした。ミトコンドリアに存在するアポトーシス促進因子である bim, リン酸化 bad, アポトーシス抑制因子である bcl2, bcl-xL, アポトーシスのマーカーとして考えられている cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, cleaved-PARP, および E-cadherin をウェスタンブロット法によって評価した。さらに、アポトーシスシグナルを誘導するリン酸化 smad2 発現についても検討した。

【結果および考察】

OBA9 において、omp-29 刺激 1 時間後に bax, bim, リン酸化 bad の発現は顕著に増加し、3 時間後には bcl2, bcl-xL の発現は減少した。また、cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, cleaved-PARP の発現も omp-29 刺激によって増加する傾向を示した。さらに、リン酸化 smad2 の発現は omp-29 刺激後、0.5~1 時間で増加した。一方で、omp-29 刺激 12, 24 時間後では E-cadherin の発現は顕著に減少していた。以上のことから、omp-29 は smad2 を介してアポトーシスシグナルを誘導すること、また歯肉上皮細胞接着を破壊することが示唆された。

歯髄細胞のマーカー遺伝子の探索

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻 顎口腔医科学講座 健康増進歯学分野
○藤井 紗貴子, 尾田 良, 西村 英紀

Research for marker genes of dental pulp cells
Graduate School of Biomedical Sciences Division of Cervico-Gnathostomatology
Department of Dental Science for Health Promotion
○Sakiko Fujii, Ryo Oda, and Fusanori Nishimura

【背景】

各臓器の機能不全のうち肝臓、腎臓や骨髄などは移植による治療法が確立している。しかし、問題は臓器ドナーの数が少なく、また、臓器移植には多大な費用が必要なことである。そこで、臓器移植に代わる新たな治療法として、近年、様々な細胞に分化する間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) の移植が注目されている。MSC は骨髄、脂肪および滑膜などから採取することができ、in vitro で未分化な状態を維持したまま増殖し、また、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、心筋細胞、神経細胞に分化できると報告されている。

歯科では、歯髄組織から分離された歯髄細胞 (Dental Pulp Cells : DPCs) は強い増殖能と石灰化誘導能、脂肪分化能などの多分化能を有するため、DPCs の移植による再生医療が期待されている。しかし、DPCs は、部分的に MSC と共通した分化能を持つものの、MSC との関係は不明である。また、歯髄細胞の遺伝子発現の特徴や、特異的マーカーは未だ不明である。そこで、本研究は DNA マイクロアレイを用いて、歯髄細胞と骨髄、脂肪、滑膜由来の間葉系幹細胞および線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルを比較することにより、歯髄細胞のマーカー遺伝子を追求した。

【材料と方法】

歯髄細胞は、健全な上顎第三大臼歯の歯髄組織から Explant 法で分離した。3 株の歯髄細胞を 10% ウシ胎児血清含有 DMEM (10% FBS 含有 DMEM) で培養し、total RNA を回収した。そして Affymetrix 社の GeneChip (HG-U133_Plus_2) を用いて、歯髄細胞、線維芽細胞、骨髄由来間葉系幹細胞、脂肪組織由来幹細胞、炎症性関節滑膜由来間葉系幹細胞、骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞 (各 3 株) の遺伝子発現プロファイルを解析し、歯髄細胞に特異的に高発現している遺伝子を抽出した。また、mRNA レベルは、Real Time RT-PCR にて測定した。

【結果】

1. 歯髄細胞に対して各間葉系幹細胞および線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルは高い相関係数 (0.91~0.94) を示した。なお、歯髄細胞株間では相関係数はさらに高く (0.97~0.98)、細胞株間の個体差が少ないことを示した。クラスター解析では、骨髄、脂肪、滑膜由来間葉系幹細胞は相互に近接していたが、歯髄細胞はこれらの間葉系幹細胞や線維芽細胞から遠い関係に位置していた。
2. 歯髄細胞に特異的に発現する遺伝子として、Growth factor の MSX1、MSX2 および TBX2、Growth factor の SFRP1 および TGFB2、Signal protein の PDE5A、Membrane protein の ENTPD1 を見出した。

【考察および結論】

本研究の結果から、歯髄細胞に特異的に高発現するマーカー遺伝子が見出された。これらのマーカー遺伝子は、歯牙発生、歯髄組織の恒常性の維持機構や歯髄細胞の分化メカニズム等の解析に役立つと考えられる。さらに、移植用細胞の品質管理にも有用であると期待される。

Sema3A がヒト歯根膜細胞の幹細胞/未分化細胞誘導に及ぼす影響

¹九州大学病院 歯内治療科、²九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、
³大阪大学大学院医学系研究科 分子病態生化学研究分野、
○和田尚久¹、前田英史¹、長谷川大学²、藤井慎介³、山本直秀²、友清淳²、門野内聡²、赤峰昭文^{1,2}

The effects of Sema3A on stemness induction of human periodontal ligament cells

¹Department of Endodontology, Kyushu University Hospital, ²Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University, ³Department of Molecular Biology and Biochemistry, Graduate School of Medicine, Osaka University
○Naohisa Wada¹, Hidefumi Maeda¹, Daigaku Hasegawa², Shinsuke Fujii³, Naohide Yamamoto², Atsushi Tomokiyo², Satoshi Monnouchi², Akifumi Akamine^{1,2}

【研究目的】

近年、歯根膜組織中に幹細胞集団が存在することが報告され、歯周組織再生において歯根膜幹細胞の有用性が期待されている。しかしながら、歯根膜幹細胞はその分化および増殖能に個人差があることから安定して単離することが難しい現状がある。そこで本研究では、より効率よく安定して幹細胞を誘導する方法を確立することを目的に、発生の過程で神経や血管系のガイダンス因子として同定され、その構築に関与していることが知られている Semaphorin 3A (Sema3A) に注目し、本因子がヒト歯根膜細胞の幹細胞/未分化細胞誘導に及ぼす効果を検討した。

【材料および方法】

1. 歯根膜における Sema3A 発現の解析：BALB/c マウス（胎生期）第一臼歯歯胚およびSD ラット（5 週齢）下顎臼歯部の組織切片を作製し、ヤギ抗 Sema3A 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。矯正治療を目的として抜去された歯より得られたヒト歯根膜細胞（HPDLC）における Sema3a 発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した。
2. Sema3A 高発現ヒト歯根膜細胞株を用いた解析：当研究室にて樹立した未分化なヒト歯根膜細胞株（1-11 細胞株：J Cell Physiol 2008, 1-17 細胞株：Differentiation 2008）および分化能を持たない歯根膜細胞株（2-52 細胞株：未発表）に Sema3A 発現プラスミドベクターを導入して Sema3A 高発現ヒト歯根膜細胞株（1-11_Sema3A、1-17_Sema3A および 2-52_Sema3A 細胞株）を樹立した。3 細胞株における幹細胞マーカーの発現を定量的 RT-PCR 法および蛍光抗体染色法にて、間葉系幹細胞（MSC）表面抗原マーカーの発現をフローサイトメトリー分析法にて解析した。また、MSC が示す分化能の一つである骨芽細胞分化能に関して、誘導培地を用いたアッセイにて検討した。

【結果と考察】

1. 抗 Sema3A 抗体を用いた免疫組織化学的染色の結果、マウス第一臼歯歯胚発生過程において歯小嚢に強い陽性反応を認め、歯根完成後のラット第一臼歯においては歯根膜組織中の一部の細胞群に陽性反応を認めた。
2. in vitro における定量的 RT-PCR 解析の結果、分化能（骨芽細胞分化および脂肪細胞分化）を示す HPDLC 群における Sema3A 発現量は、分化能を持たない HPDLC 群における発現量と比較して有意に高かった。以上の結果から Sema3A が未分化な歯根膜細胞において重要な役割を担う因子であることが推察された。
3. 定量的 RT-PCR 法および蛍光抗体染色法による解析にて、1-11_Sema3A、1-17_Sema3A および 2-52_Sema3A 細胞株における幹細胞マーカー（Oct4, nanog, E-cadherin, Sox2）の発現が empty vector 導入細胞株（1-11_e、1-17_e および 2-52_e 細胞株）と比較して上昇していた。また、フローサイトメトリー分析法にて、Sema3A 高発現ヒト歯根膜細胞株（2-52_Sema3A 細胞株）における MSC 表面抗原マーカー（CD90, CD105, CD146, CD166）の発現強度が上昇していた。以上の結果から、歯根膜細胞が Sema3A 発現によって未分化なステージに誘導されることが示唆された。
4. 2-52_Sema3A 細胞株および 2-52_e 細胞株を用いて骨芽細胞分化誘導アッセイを行ったところ、2-52_e 細胞株は石灰化を認めなかったが、2-52_Sema3A は石灰化が誘導され、骨関連遺伝子（Runx2, osteocalcin, osteopontin, type I Co1）の発現が上昇していた。一方で、Sema3A の発現は培養 1 日目をピークに 4 週目までに減少していた。以上の結果から、骨芽細胞分化能を持たない 2-52 細胞株が Sema3A の強制発現により分化能を獲得したことが示唆された。

【結論】

Sema3A は歯根膜細胞における幹細胞マーカーおよび MSC マーカーの発現ならびに分化能を誘導する。

共同研究者：高知愛（山口大学大学院医学系研究科 眼科学研究分野）、和田裕子（九州大学大学院歯学研究院 口腔病理学研究分野）

低出力半導体レーザー照射が培養ヒト歯肉上皮細胞に及ぼす効果

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯周病学分野
²日本大学歯学部生化学教室, ³奥羽大学薬学部生化学分野
⁴東京医科歯科大学グローバル COE プログラム歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点
○江尻健一郎¹, 青木章¹, 山口洋子², 大島光宏³, 和泉雄一^{1,4}

Effect of Low-level Diode Laser Irradiation on Cultured Human Gingival Epithelial Cells

¹Department of Periodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

² Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry

³Department of Biochemistry, Ohu University School of Pharmaceutical Sciences

⁴Global Center of Excellence Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases

○Kenichiro Ejiri¹, Akira Aoki¹, Yoko Yamaguchi², Mitsuhiro Ohshima³, Yuichi Izumi^{1,4}

【研究目的】

組織を破壊あるいは変性しない低出力レベルのレーザー光には付加的な生物学的効果があり、細胞の増殖促進、石灰化の促進、炎症や疼痛の緩和、創傷治癒促進など様々な効果が報告されている。半導体レーザーは組織深達性の高い近赤外波長を発振し、低出力で組織細胞の活性化、治癒および再生の促進が期待されるため、口腔の軟組織および硬組織の創傷部に応用されている。しかし、その生物学的効果に関する研究は十分ではなく、特にヒト歯肉上皮細胞への影響を調べた報告は見当たらない。そこで本研究は、低出力半導体レーザー照射が培養ヒト歯肉上皮細胞の増殖に及ぼす効果について検討した。

【材料および方法】

細胞培養：被験者の同意のもと、歯周外科手術時に切除した余剰な歯肉から、Ohshimaら(2008)の方法にてヒト歯肉上皮由来細胞(HGE)を初代培養した(東京医科歯科大学歯学部倫理委員会承認済み)。I型コラーゲンコートフラスコおよび増殖添加剤を加えたEpi Life(Gibco)を用いて継代培養した後、継代数3~4の細胞を実験に用いた。

レーザー装置：創傷治癒促進および疼痛緩和用に開発された低出力半導体レーザー装置 Lumix 2 HFPL (Fisioline s. n. c. 社)を用いた。本装置は波長 904-910 nm、パルス幅 200 ns で、33 W の高いピークパワーと 30 kHz の高い繰り返し周波数のパルスレーザーを発振する。レーザー照射時には、細胞への均等な照射を行うために、ハンドピースを固定し、24穴プレートのウェル底部より 3.5 cm 垂直上方から照射した(パワー密度 94.4 mW/cm²)。

WST-8 Assay および [³H]-thymidine の取り込み：24穴I型コラーゲンコートプレートにHGEをサブコンフルエントに培養し、増殖添加剤飢餓を施した後、低出力半導体レーザーを1および5分照射した。照射1日後にWST-8 Assay および [³H]-thymidine の取り込みによる細胞増殖の評価を行った。

Western blot analysis：上記と同様に培養した後、低出力半導体レーザーを5分照射し、照射後のMAPK経路におけるERK、p38、JNKのリン酸化をWestern blotにて解析した。

Wound healing assay：24穴I型コラーゲンコートプレートにHGEをコンフルエントに培養し、シリコンチップにて幅2mmのscratch woundを作製後、増殖添加剤未添加の培地に交換した。次に低出力半導体レーザーを1および5分照射し、照射1および2日後に細胞をクリスタルバイオレットにて染色後、細胞遊走の評価を行った。

【結果】

WST-8 Assayおよび[³H]-thymidineの取り込みによる細胞増殖の評価では、照射1日後に照射群で細胞増殖促進傾向または有意な促進が認められた。1分照射と5分照射との比較では、増殖に有意な差は認められなかった。レーザー照射によりERKのリン酸化が認められたが、p38、JNKのリン酸化は認められなかった。wound healing assayによる評価では、照射2日後に照射群で細胞の遊走促進が認められた。

【考察および結論】

歯肉切除後に低出力半導体レーザーの照射を行い未照射群と比較した臨床研究では、レーザー照射側で歯肉の再上皮化が促進したとの報告がある。本研究の結果は、低出力半導体レーザー照射がヒト歯肉上皮細胞の増殖および遊走を促進することを示しており、MAPK/ERKの活性化の関与が示唆された。本レーザー照射は歯肉の創傷治癒促進に有効であろうと推察される。

断眠による疲労はラットの実験的歯周炎による骨吸収量を増加させる

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座
○中田 智之, 沼部 幸博

The fatigue by partial sleep division increases the amount of bone resorption by the experimental periodontitis of a rat.

Department of Periodontology, Nippon Dental University School of Life Dentistry at Tokyo
○NAKADA Tomoyuki, NUMABE Yukihiko

【研究目的】

断眠による疲労状態は、サイトカインやホルモンの変調をきたし、心血管疾患や白血球数の減少を引き起こす。歯科領域では、疲労の自覚が歯の喪失と関係し、労働が強度である群で歯肉の炎症が強くなると報告されている。しかし、疲労が歯周疾患のリスク因子であるかは明らかになっていない。本研究では、疲労は歯周疾患を進行させるリスク因子かを検討する。

【材料および方法】

3週齢、雄性の Sprague-Dawley 系列ラット 24 匹を、1 群 6 匹として以下の 4 群に無作為に分けた。Control-Native 群、Fatigue-Native 群、Control-Inflammation 群、Fatigue-Inflammation 群。飼育期間中は週に 1 度の体重測定を行った。感染実験に供する *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株は、brain heart infusion 液体培地に hemin(5ug/ml)、menadione(0.5ul/ml)を添加した培地を用い嫌気条件下、37°C で 48 時間培養した。培養後、遠心分離 (3500rpm、15 分間) により集菌した。Inflammation 群は抗菌薬投与より 2 日の緩衝期間を経た 6 日目より 1 週間に 3 度、1 日以上の間隔を空けて口腔内に *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株 1.5×10^{10} cells/ml を含む 5% Carboxymethyl Cellulose を投与した。Native 群は同じ日程で口腔内に 5% Carboxymethyl Cellulose のみを投与した。以上の感染実験を 4 週間行った。Fatigue 群では 36 日目より 7 日間、ケージに深さ約 1.5cm、水温 23°C の水を張り、筋弛緩を伴う深睡眠を妨害した。Control 群は同じ期間通常のケージにて飼育した。断眠疲労実験後、その影響が歯槽骨に反映される期間として、2 週間の観察を行った。57 日目に、全てのラットをペントバルビタール (300mg/kg) の腹腔内投与にて安楽死させ、上顎歯肉・歯槽骨・血液を採取した。評価はマイクロフォーカス X 線 CT 画像解析、病理組織解析、歯肉における炎症性サイトカイン関連 mRNA 発現解析、血中蛋白解析にて行った。

【結果】

マイクロフォーカス X 線 CT 画像解析の結果、上顎第二臼歯近心根周囲歯槽骨について、Control-Native 群に比べて Control-Inflammation 群・Fatigue-Inflammation 群で CEJ-ABC 距離が有意に増加し、Fatigue-Inflammation 群で最大となった。病理組織解析の結果、Control-Native 群が正常な歯肉溝の組織像を示すのに対し、Control-Inflammation 群・Fatigue-Inflammation 群では上皮細胞層の肥厚・細胞間隙の拡大・角化層の剥離が認められた。Fatigue-Inflammation ではこれらの変化が最も顕著であった。リアルタイム PCR による炎症性サイトカイン関連 mRNA 発現解析では、IL-1 β 関連 mRNA 発現量は Control-Native 群と比べ、Control-Inflammation 群・Fatigue-Inflammation 群で有意に増加した。TNF- α 関連 mRNA 発現量は、Fatigue-Inflammation 群で有意に増加した。IFN- γ 関連 mRNA 発現量は有意な変化は見られなかった。血中蛋白測定において、血清中 Corticosterone は Control-Native 群と比べ、Fatigue-Native 群・Fatigue-Inflammation 群で増加傾向が見られた。

【考察および結論】

本実験では断眠疲労によって、実験的歯周炎による骨吸収量・歯肉溝上皮の変化・炎症性サイトカイン関連 mRNA 発現量の増加がみられた。以上より、断眠疲労は歯周疾患のリスク因子である可能性が示された。

**β -TCP 含有ゼラチンハイドロゲルを用いた歯周組織再生
イヌ上顎根分岐部骨欠損における組織学的評価—a pilot study—**

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 生体硬組織再生学講座 歯周病学分野¹,

東京医科歯科大学 歯学部附属病院 歯科総合診療部²,

東京医科歯科大学グローバルCOEプログラム歯と骨の分子疾患科学の国際教育拠点³

京都大学 再生医科学研究所 生体組織工学部門 生体材料学分野⁴

○星 嵩¹, 秋月 達也¹, 松浦 孝典¹, 今村 亮祐¹, 小田 茂²,

松井 誠⁴, 田畑 泰彦⁴, 和泉 雄一^{1,3}

**Periodontal regeneration using β -TCP gelatin gel in the treatment of class II
furcation defects: a pilot study in dogs**

Department of Periodontology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University¹

Oral Diagnosis and General Dentistry, University Hospital of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University²

GCOE program “International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases” at TMDU³

Department of Biomaterials, Field of Tissue Engineering, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University⁴

○Hoshi S¹, Akizuki T¹, Matsuura T¹, Imamura R¹, Oda S², Matsui M⁴, Tabata Y⁴, Izumi Y^{1,3}

【研究目的】

歯周組織の再生には細胞、細胞増殖因子、スキャフォールドの三つの要素が必要とされる。過去の研究では、スキャフォールドとして自家骨、他家骨、人工骨、生物由来材料が開発・応用されてきたが、細胞、細胞増殖因子を保持し、その場にとどまる材料としてはまだ開発の余地がある。中でも β -Tricalcium phosphate (TCP)は吸収性の合成材料として研究が進んでいるが、従来のものは顆粒状もしくはセメント状のものが多く、それぞれ形態を保持しづらく、細胞が入りづらいという欠点があった。この度、新規材料として、従来の研究で使われてきた β -TCP にゼラチンを組み合わせたスポンジ状に加工することにより細胞、細胞増殖因子が入り込めるスペースを持たせたゼラチンハイドロゲルを開発した。本研究では外科的に作成したビーグル犬 2 度根分岐部骨欠損にゼラチンハイドロゲルを応用した際における歯周組織の治癒について病理組織学的に評価した。

【材料および方法】

〈ゼラチンハイドロゲル〉

ゼラチン水溶液（新田ゼラチン社製、最終濃度 3 wt%）と β -TCP 懸濁液（太平化学工業社製、最終濃度 3 wt%）の混合物を攪拌後、グルタルアルデヒドにて化学架橋を行いポアサイズ約 150-200 μm のスポンジ状に加工した。

〈実験方法〉

ビーグル成犬 2 頭（オス）を使用した。上顎第三前臼歯に根分岐部歯周組織欠損を外科的に作成した。全身麻酔および局所麻酔下にて、粘膜骨膜弁を剥離翻転し、垂直的に根分岐部より 5mm、頬舌的な深さは 2mm の欠損を作製した（2 度根分岐部骨欠損）。実験側ではゼラチンハイドロゲルを欠損部に補填し、対照側では何も補填せず縫合を行った。術後 4 週で屠殺・還流固定し、標本ブロックを採取した。得られた標本ブロックから通法に従い脱灰切片を作製し、H. E. 染色および Azan 染色を行い、光学顕微鏡下で病理組織学的に評価を行った。

本研究は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得た上で行った。

【結果】

口腔内所見では実験側、対照側で術後一ヶ月では炎症は認められず良好な治癒が認められた。病理組織所見では実験側で根分岐部骨欠損中央部に β -TCP 様構造物が認められた。根面においては新生セメント質様組織像が認められた。

【考察と結論】

実験側に臨床的に良好な治癒が認められたことより、移植した材料の生体為害性は低いと考えられる。術後 4 週で β -TCP 様構造物が欠損内にとどまっていることが確認でき、スキャフォールドとしての役割を果たしていると考えられる。本材料は再生のスキャフォールドとなる可能性が認められたため、今後、隙間に細胞や細胞増殖因子を組み込むことでさらなる再生を期待した実験を計画中である。

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金#23792465、歯と骨のグローバル COE プログラムにより行われた。

ランダムトンネル型 β -TCPを用いた歯周組織再生 —イヌ下顎1壁性骨欠損における組織学的評価—

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野¹,
東京医科歯科大学 図書館情報メディア機構 教育メディア開発部²,
東京医科歯科大学 グローバルCOEプログラム 歯と骨の分子疾患科学の国際教育拠点³
北海道大学 大学院歯学研究科⁴, 株式会社 パイロットコーポレーション⁵
○松浦孝典¹, 秋月達也¹, 星嵩¹, 木下淳博², 須永昌代², 井川貴博¹, 木村満利子⁵,
久保木芳徳⁴, 和泉雄一^{1,3}

Periodontal tissue regeneration using random tunnels-shaped beta-TCP ceramics in dogs :histological evaluations of 1-wall infrabony defect

Department of Periodontology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University¹
Department of Educational Media Development, Tokyo Medical and Dental University²
GCOE program “International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases” at TMDU³
Graduate School of Dental Medicine⁴, Hokkaido University, PILOT Corporation⁵
○MATSUURA Takanori¹, AKIZUKI Tatsuya¹, HOSHI Shu¹, KINOSHITA Atsuhiko², SUNAGA Masayo²,
IKAWA Takahiro¹, KIMURA Mariko⁵, KUBOKI Yoshinori⁴, IZUMI Yuichi^{1,3}

【研究目的】

組織再生の3要素が細胞、増殖因子、スキャフォールドであることはよく知られている。その中でスキャフォールドの幾何学的な構造が細胞増殖と分化、および組織再生に重要であり、これまでの研究で貫通構造(孔径 300-400 μ m)をもトンネル型の骨補填材は血管新生および骨新生に有用であることが示唆されている。しかし骨形成方向が一定なため、補填材間の骨形成が不足することが懸念されている。そこで補填材の構造をランダムトンネル型とし、その方向を任意とした骨補填材を新たに作製した。この材料は β -Tri Calcium Phosphate (TCP)からなり、ランダムトンネル型にすることで骨形成の効率を増大できると考えられている。本研究では、外科的に作製したイヌ下顎1壁性骨欠損にランダムトンネル型 β -TCPを応用することで歯周組織再生が得られるかを組織学的に評価した。

【材料および方法】

ビーグル成犬2頭(オス)を使用した。術前12週に全身麻酔および局所麻酔下にて、下顎2、第3前歯の抜歯を行った。12週後、粘膜骨膜弁を剥離し、左右下顎犬歯近心に近遠心幅4mm深さ8mmの1壁性骨欠損を外科的に作製し、露出した歯根面のルートプレーニングを行った。実験側ではランダムトンネル型 β -TCPを欠損部に補填し、対照側では何も補填せず縫合閉鎖を行った。今回用いたランダムトンネル型 β -TCPは気孔率69%、パイプ長0.9mm、パイプ外径0.5mm、パイプ内径0.3mmの構造のものを使用した。術後4週および8週にデンタルX線写真を撮影した。術後12週に屠殺、還流固定し、標本ブロックを採取した。得られた標本をmicroCTで撮影した。その後、脱灰切片を作製し、H.E.染色およびAzan染色を行い、光学顕微鏡下で組織学的に評価を行った。

本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得た上で行った。

【結果】

術後の経過において、実験側、対照側ともに臨床的に炎症所見は認められなかった。組織学的評価では、実験側では歯冠側においても骨様硬組織の新生を認めた。また歯根象牙質表面には新生セメント質様硬組織を認めた。術後12週において、補填材は完全には吸収されず残存しており、管腔構造の内壁には骨様硬組織の新生を認め、その中心部では血管の新生を認めた。

【考察と結論】

臨床所見、組織学的観察から、本材料には生体為害性はなく、生体親和性の良い材料と考えられる。実験側では正常な歯周組織様の組織が認められ、術後12週でも完全に吸収されないため、1壁性骨欠損における歯周組織再生において、スペースメイキング材として有効であると示唆される。今回の実験は2頭の結果であり、現在頭数を増やし更なる検討を行っている。

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金#23792465、歯と骨のグローバルCOEプログラムにより行われた。

スフィンゴシン-1-リン酸は骨芽細胞において Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化する

九州大学大学院歯学研究院 歯周病学分野

○松崎 英津子、平塚 俊志、濱地 貴文、小林 茉莉、橋本 陽子、前田 勝正

Sphingosine-1-phosphate activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway in osteoblast-like cells

Department of Periodontology, Faculty of Dental Sciences, Kyushu University

○Etsuko Matsuzaki, Shunji Hiratsuka, Takafumi Hamachi, Mari Kobayashi, Yoko Hashimoto,
Katsumasa Maeda

<目的>

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、細胞膜上のGタンパク質共役受容体 (S1P₁~S1P₅) に結合することにより、種々の細胞に対して、増殖・運動・形態調節、分化など多彩な作用を及ぼす脂質メディエーターとして注目されている。近年、S1P が破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への成熟を阻止し、骨吸収を抑制することが報告されている。しかしながら、S1P が骨芽細胞に及ぼす影響についての知見は少ない。

一方、Wnt シグナル伝達経路は、初期発生、形態形成、出生後の細胞の増殖・分化・運動、がんなどを制御する。中でも、DNA 結合タンパク質の T-cell factor (TCF)ファミリーと結合して転写を活性化する β -カテニンの細胞内への蓄積を介する β -カテニン経路が標準経路として知られている。骨芽細胞の分化・遺伝子発現には、この Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路が重要である。

そこで今回、S1P が骨芽細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について、特に Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路との関わりについて検討した。

<材料および方法>

実験には、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 SaOS-2 及びマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。試薬として、S1P (100-2000 nM、BIOMOL)、または Wnt-3a (50-100 ng/ml、R&D systems)、LY294002 (50 μ M、Sigma)を用いた。

mRNA 発現については real-time RT-PCR 法を、タンパク質発現についてはウエスタンブロット法を用いて検討した。また、 β -カテニンの核移行については、蛍光免疫染色法を用いて検討した。TCF 転写活性は、TOPflash (TCF レポータープラスミド) または FOPflash (TOPflash のネガティブコントロール)を用いて検討した。

<結果および考察>

SaOS-2 および MC3T3-E1 細胞において、S1P は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路において重要な役割を果たす GSK-3 β の活性を阻害し、この経路の転写因子である TCF7L2 のタンパク質発現、TCF 転写活性を増加させた。また、S1P の添加により、 β -カテニンの細胞質から核内への移行が認められた。すなわち、S1P は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化した。この作用は、S1P シグナル伝達経路 (PI3K/Akt/GSK-3 β 経路) において、GSK-3 β の上流に存在する PI3K の特異的阻害剤である LY294002 の添加により抑制された。さらに、S1P は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子である Axin2 および Osteoprotegerin (破骨細胞抑制因子) の mRNA 発現を増加させた。

以上の結果から、骨芽細胞において、S1P は S1P シグナル伝達経路を介して、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化することが示唆された。

<結論>

S1P は、骨芽細胞において Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化し、骨形成に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

ダイオキシン関連物質がヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

¹九州大学歯学研究院口腔機能修復学講座歯科保存学研究分野

²九州大学病院歯内治療科

○門野内聡¹, 前田英史², 友清淳¹, 和田尚久², 河野清美², 郡勝明¹, 山本直秀¹, 寺松陽子¹, 赤峰昭文^{1,2}

The effect of Dioxins on osteoblast differentiation in human periodontal ligament cells

¹Department of Endodontology and Operative Dentistry, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of

Dental Science, Kyushu University, ²Department of Endodontology, Kyushu University Hospital

○¹Satoshi Monnouchi, ²Hidefumi Maeda, ¹Atsushi Tomokiyo, ²Naohisa Wada, ²Kiyomi Kono,

¹Katsuaki Koori, ¹Naohide Yamamoto, ¹Yoko Teramatsu, and ^{1,2}Akifumi Akamine

【研究目的】

我々は、ダイオキシンを原因とする中毒症であるカネミ油症の患者において、歯周病進行の指標である歯周ポケットの深化傾向が認められることを報告した(Hashiguchi et al. Fukuoka Igaku Zasshi 102: 75-80, 2011)。また、ダイオキシン関連物質の一つである benzo(a)pyrene (BaP) で刺激したヒト歯根膜細胞(HPDLC)において、ダイオキシンの毒性シグナルである arylhydrocarbon receptor (AhR)シグナルが活性化し、MMP-1 の発現上昇及び Col I の発現減少が認められたことを第 128 回本大会にて報告した。そこで本研究では、歯周ポケットの深化へ BaP が及ぼす影響についてさらなる解析を行うため、BaP が HPDLC の骨芽細胞分化に与える影響を検討することを目的とした。

【材料及び方法】

(1)HPDLC における BaP 添加後の骨関連遺伝子発現解析: 矯正治療を目的に本院を受診した患者(26 歳女性)より抜去歯を得たのち歯根膜を採取し、4-6 継代培養した細胞を HPDLC として本研究に供した。細胞は、10%Fetal Bovine Serum 含有の α -MEM 中に、石灰化誘導因子 (beta-glycerophosphate, ascorbic acid, dexamethasone) を添加して培養を行った。ダイオキシン関連物質として BaP を HPDLC に添加し、定量的 RT-PCR 法にて骨関連遺伝子 (alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN)) の mRNA 発現を解析した。なお、本研究は九州大学歯学研究院倫理委員会規定の認可を得て、患者様の同意の上で行われた。

(2)HPDLC における BaP 添加後の石灰化機能解析: BaP を添加した HPDLC における ALP 活性を、ALP Assay Kit (Takara)を用いて測定した。さらに、Arizarin red 染色および von Kossa 染色を行い、BaP 添加後の HPDLC における石灰化結節の形成能を評価した。

(3)BaP で刺激された HPDLC におけるシグナリング解析: BaP の細胞内レセプターである AhR の inhibitor (Resveratrol (Res)) にて前処理した HPDLC に BaP を添加し、定量的 RT-PCR 法にて代謝酵素の mRNA 発現を解析した。

【結果および考察】

BaP が添加された HPDLC における遺伝子発現を解析した結果、ALP, BSP および OPN の遺伝子発現が BaP 添加群で有意に抑制された。また、ALP の活性および石灰化結節の形成も、BaP 添加群で有意に抑制された。これらの結果から、BaP 刺激は、HPDLC における骨芽細胞分化および石灰化を抑制することが示唆された。さらに、Res にて HPDLC を前処理した結果、代謝酵素である Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) の BaP で誘導された遺伝子発現が抑制される傾向が認められた。したがって、HPDLC において BaP による AhR シグナルの活性には CYP1B1 が関与していることが推察された。以上の結果から、ヒト歯根膜細胞において CYP1B1 を介した AhR シグナルは骨芽細胞分化および石灰化を抑制し、骨代謝に影響を与えることで歯周ポケットの深化に関与することが示唆された。

【結論】

ダイオキシン関連物質の一つである BaP が、ヒト歯根膜細胞における骨芽細胞分化および石灰化の抑制を誘導する。

ラット骨芽細胞の分化発現に及ぼす最終糖化産物及びリポ多糖の影響

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野
○坂本英次郎, 美原智恵, 生田貴久, 稲垣裕司, 木戸淳一, 永田俊彦

Effect of advanced glycation end-product and lipopolysaccharide on the differentiation of rat osteoblastic cells

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School

○SAKAMOTO Eijiro, MIHARA Chie, IKUTA Takahisa, INAGAKI Yuji, KIDO Jun-ichi, NAGATA Toshihiko

【研究目的】

歯周病は糖尿病の合併症であり、糖尿病患者は歯周病になりやすく重症化しやすい。糖尿病患者では、骨組織中のコラーゲン構造の変化により骨が脆くなることが知られているが、骨代謝における糖尿病因子の影響については未知の部分が多く、また糖尿病関連歯周炎における歯槽骨の分子レベルでの病態変化はほとんど不明である。一方、糖尿病合併症の主要な原因物質として最終糖化産物 (advanced glycation end-product: AGE) が注目されている。本研究では、糖尿病関連歯周炎における歯槽骨代謝の病態解明研究の手始めとして、培養ラット骨髄由来骨芽細胞の分化発現に及ぼす AGE および歯周病原細菌由来リポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) の影響を検討した。

【材料と方法】

1. AGE の調製: AGE は Ogawa らの方法に従って、ウシ血清アルブミン (BSA, 50 mg/ml) と D-グルセルアルデヒド (0.1 M) をリン酸緩衝液に溶解し、37°C で 7 日間反応させた後、透析を行い調製した。
2. 細胞の分離と培養: 5 週齢雄性 Wister ラットの大腿骨から Maniopoulos らの方法に従って骨髄由来細胞を採取し、15% ウシ胎児血清を含む α -MEM 培地に培養を行い、継代 3 代目の細胞を以下の実験に用いた。細胞はサブコンプレント後、アスコルビン酸 (50 μ g/ml)、 β グリセロリン酸 (10 mM) およびデキサメタゾン (0.1 mM) を含む骨芽細胞分化誘導培地に交換し、AGE (50-500 μ g/ml)、*P. gingivalis* 由来 LPS (P-LPS: 1-1000 ng/ml, InvivoGen) および BSA (500 μ g/ml) を培地に添加し、一定期間培養した。
3. 細胞増殖および骨芽細胞分化発現への影響: AGE および P-LPS による細胞生存率への影響は Cell counting kit® を用いて検討した。骨芽細胞分化発現への影響は、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性および von Kossa 染色による石灰化骨様結節 (bone nodule: BN) 数の測定により検討した。
4. 遺伝子発現分析: AGE および P-LPS を作用させた骨髄由来細胞から全 RNA を分離し、通法に従って cDNA を作製し、RT-PCR 法にて骨基質蛋白および骨代謝関連因子の遺伝子発現に及ぼす AGE および P-LPS の影響を検討した。

【結果】

使用した濃度の AGE および P-LPS は細胞生存率に有意な影響を与えなかった。AGE と P-LPS による ALP 活性への影響を検討した結果、添加 4 日目で有意な抑制効果が現れ、AGE (50-500 μ g/ml) および P-LPS (1-1000 ng/ml) で濃度に依存した抑制傾向がみられた。500 μ g/ml AGE と 1000 ng/ml P-LPS で、それぞれ有意な ALP 活性の抑制効果が認められたが、AGE+P-LPS 群では有意な相加的抑制効果は認められなかった。一方、BN 形成については 250 μ g/ml 以上の AGE と 100 ng/ml 以上の P-LPS によって有意な BN 形成の抑制が認められた。また、AGE 群と P-LPS+AGE 群を比較すると、P-LPS+AGE 群の方がより抑制される傾向がみられた。遺伝子発現については AGE によりオステオポンチンおよび *cbfa1* の発現抑制がみられ、さらに AGE+P-LPS 群ではより強い抑制が認められた。一方、I 型コラーゲンの発現には影響が認められなかった。

【考察と結論】

糖尿病合併症の主要な原因物質である AGE は骨髄由来細胞培養系における骨芽細胞分化発現を抑制し、ALP 活性、骨代謝関連因子の発現および BN 形成を減少させた。その効果は P-LPS により増強される傾向があった。これらの結果から、糖尿病関連歯周炎では、AGE と歯周病原細菌が骨芽細胞の分化発現抑制因子となって、歯周組織において為害作用を発揮している可能性が考えられる。