

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06391

研究課題名(和文) B細胞特異的CD40ノックアウトマウスを用いた歯槽骨代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of bone metabolism in B cell-specific CD40 conditional knockout mice

研究代表者

藤原 千春 (FUJIHARA, CHIHARU)

大阪大学・歯学研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：00755358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、B細胞特異的なCD40コンディショナルノックアウトマウス(B cell CD40cKO)を作成し、B細胞上のCD40が骨代謝恒常性維持にどのような影響を及ぼすのかを検討した。作成したB cell CD40cKOはコントロールマウスと比較して、やや小さな体幹を呈し、大腿骨骨端部分の骨梁構造の異常、同部の骨密度や骨量の減少を認めた。以上の結果より、B細胞のCD40は骨代謝の恒常性の維持に寄与することが明らかとなった。今後、歯周炎のような炎症状態において、歯槽骨代謝にB細胞上のCD40が果たす役割を明らかにしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated B cell-specific CD40 conditional knockout mice (B cell CD40cKO) to analyze the influence of CD40 on B cells on bone metabolism. B cell CD40cKO mice were smaller compared to control mice. The structure of the trabecular bone of femurs of B cell CD40cKO mice was destroyed. Furthermore, bone mineral density and bone volume were decreased in B cell CD40cKO mice, compared to control mice. Thus, CD40 on B cells is important for maintenance of bone homeostasis. We are currently analyzing the roles of CD40 on B cells under an inflamed condition using periodontitis-induced B cell CD40cKO mice.

研究分野：歯学

キーワード：CD40 B細胞 骨代謝 コンディショナルノックアウトマウス 歯周炎

1. 研究開始当初の背景

CD40 分子は免疫細胞である B 細胞上に主に発現しており、同分子を介したシグナルにより B 細胞からの RANKL/OPG の産生を調節し、骨代謝に関与していることが示唆されている。歯周炎病巣局所には、CD40 陽性の B 細胞が多数遊走・定着していることから、これら B 細胞上の CD40 から誘導されるシグナルが、破骨細胞の分化を活性化することで、歯槽骨破壊を引き起こすことが想定できる。しかしながら、CD40 は、B 細胞以外の歯周組織構成細胞 (例えば、骨芽細胞や破骨細胞、歯根膜細胞、歯肉線維芽細胞など) にもわずかながら発現が認められるため (Shrumet.al, 2003, Nemoto et.al, 2002)、B 細胞上の CD40 が骨代謝において果たす役割を厳密に明らかにすることは極めて困難であった。そこで、B 細胞特異的 CD40 コンディショナルノックアウトマウス (B cell CD40cKO) を作成することで、B 細胞上に発現する CD40 が、骨代謝の恒常性維持や、歯周炎のような炎症下における歯槽骨の代謝にどのような影響を引き起こすのかを解析することが可能になるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、B 細胞特異的な CD40 コンディショナルノックアウトマウス (B cell CD40cKO) を作成し、B 細胞上の CD40 が骨代謝の恒常性維持にどのような影響を及ぼすのか、さらに、マウス実験的歯周炎モデルを導入することで、歯周炎のような炎症状態において、B 細胞上の CD40 が骨代謝制御に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) B 細胞特異的 CD40 コンディショナルノックアウトマウスの作成

CD40 BAC clone を用いて BAC トランスジェニックシステムにより、CD40^{fllox} マウスを作成した。すなわち、2 つの loxP を BAC 上で相同組み換えにより CD40 locus に挿入し、CD40 遺伝子のエクソン 2 とエクソン 3 を loxP で挟んだ。さらに、作成した CD40^{fllox} マウスを CD40KO と交配することで、CD40^{fllox}CD40KO マウスを作成した。このマウスを、B 細胞特異的 Cre マウス (CD19Cre マウス (CD40KO バックグラウンド)) と交配することで、B 細胞特異的 CD40 コンディショナルノックアウトマウスを作成した。

(2) 脾臓 B 細胞及び脾臓樹状細胞における CD40 発現解析

マウスより脾臓を摘出し、赤血球を Lysis buffer を用いて溶血し、白血球分画を単離した。単離した白血球を抗 CD19 抗体 (B 細胞マーカー) と抗 CD11c 抗体 (樹状細胞マーカー)

一) を用いて染色し、フローサイトメーターを用いて B 細胞及び樹状細胞における CD40 の発現を解析した。

(3) 大腿骨骨端の病理組織学的評価法

マウス右側大腿骨を摘出し、4%PFA に 1 日浸染し、その後 EDTA にて脱灰して、パラフィンブロックを作成した。非脱灰標本を作成した後、HE 染色を施し、大腿骨端の骨梁構造の変化を顕微鏡にて観察した。

(4) μ CT を用いた大腿骨の形態及び骨塩量の測定

マウス左側大腿骨を摘出し、100%エタノールに浸染した後、遠位骨端部成長板から 0.5mm の位置で海綿骨の断層撮影を行った。海綿骨の 3 次元骨塩量測定を TRI/3D-BON を用いて解析した。

(5) マウス実験的歯周炎誘導と歯槽骨吸収の評価

マウス上顎左側第二臼歯に 5-0 の太さの絹糸を結紮することで実験的に歯周炎を誘導した。7 日後にマウスの上顎骨を回収し、100%エタノールに浸染した後、 μ CT を用いて同部位を撮影した。上顎左側第一～第三臼歯根におけるエナメル-セメントジャンクションから歯槽骨頂までの距離の合計を計測した。

4. 研究成果

(1) B 細胞特異的 CD40 コンディショナルノックアウトマウスの作成

BAC トランスジェニックシステムにより、CD40^{fllox} マウスを作成し、CD40^{fllox} マウスを CD19Cre マウスと交配することで、B 細胞特異的 CD40 コンディショナルノックアウトマウス (B cell CD40cKO) を作成した (図 1 上段)。

作成したマウスの脾臓 B 細胞及び、樹状細胞上の CD40 の発現をフローサイトメーターにて確認すると、B cell CD40cKO マウスでは、脾臓 B 細胞上の CD40 の発現は欠失していたが、樹状細胞上では CD40 の発現を認めた。一方、コントロールマウスである CD40^{fllox} マウスでは、脾臓 B 細胞でも樹状細胞上でも CD40 の発現を認めた (図 1 下段)。これより、作成したマウスは、B 細胞特異的に CD40 をノックアウトできていることを確認した。

3 ヶ月齢同腹のオスのマウスにおいて、B cell CD40cKO はコントロールマウスと比較してやや体が小さい傾向を認めた。

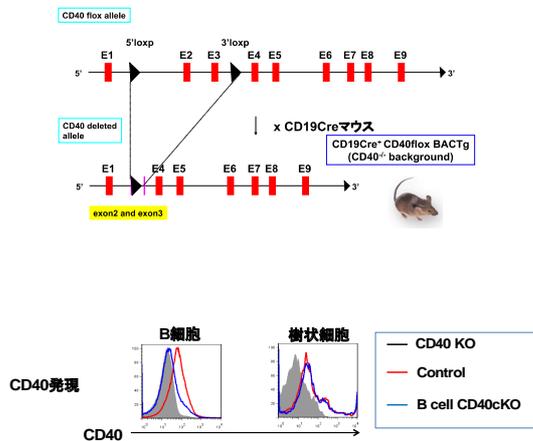


図1. B細胞特異的 CD40 ノックアウトマウスの作成
 上段: B細胞特異的 CD40cKO 作成のためのターゲティングベクターマップ
 下段: 脾臓 B細胞と樹状細胞における CD40 の発現

(2) 大腿骨骨端の病理組織学的評価

3ヶ月齢同腹のオスのマウスの大腿骨遠位骨端部の病理組織学的評価を行った。HE染色の結果、B cell CD40cKO マウスでは、コントロールマウスと比較して骨端部海綿骨における骨梁構造に異常を認めた (図2)。

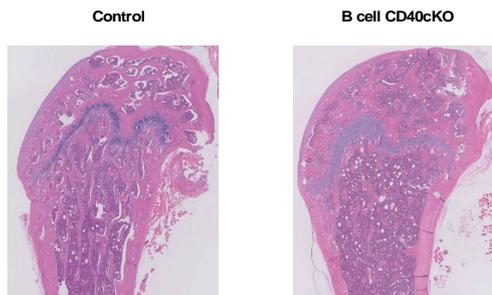


図2: マウス大腿骨遠位骨端部の HE 染色像

(3) 大腿骨骨端海綿骨の形態測定・骨塩量測定

3ヶ月齢同腹のオスのマウスの大腿骨遠位骨端部を μ CT 撮影し、同部位海綿骨の形態測定及び、海綿骨の骨塩量を計測した。断層撮影の結果、B cell CD40cKO マウスではコントロールマウスと比較して、海綿骨における骨梁の減少を認めた (図3 上段)。さらに、同部位における海綿骨の骨密度 (BMD) を計測すると、B cell CD40cKO マウスでは骨密度の減少及び、骨ミネラル量 (BMC) の低下を認めた (図3 下段)。

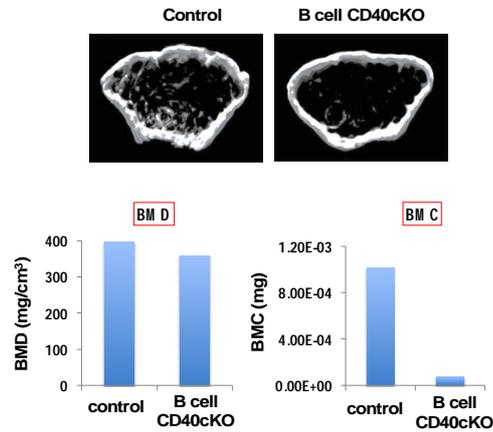


図3: マウス大腿骨骨端部の海綿骨形態・骨塩量測定
 上段: マウス大腿骨遠位骨端部の μ CT 断層像
 下段: マウス大腿骨骨端部海綿骨の骨密度 (BMD) と骨ミネラル量 (BMC)

(4) マウス実験的歯周炎モデルを用いた歯槽骨吸収の検討

3ヶ月齢同腹のオスの上顎左側第二臼歯に絹糸を巻き、実験的に歯周炎を誘導した。7日後、同部位を μ CT 撮影し、歯槽骨の吸収の程度を比較した。B cell CD40cKO ではコントロールマウスと比較して、歯槽骨の吸収量が減少する傾向を認めた。しかしながら、一部のマウスで結紮した絹糸の脱落や断裂を認めたため、十分な解析匹数が得られなかった。今後は、マウスの解析数を増やすことで、更なる検討を進めるとともに、結紮に依存しない歯周炎誘導方法 (例えば、歯周病原菌の歯牙への塗布) を用いることで、歯周炎病態における B細胞上の CD40 の歯槽骨代謝に及ぼす影響を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 7 件)

藤原 千春、「CD40 分子が誘導するダイナミックな生体機能」、第二回口腔医科学フロンティア、2017年3月5日、山形

藤原 千春、Richard Hodes、Joy Williams、「CD40-CD40L interaction maintains thymic B cells in absence of MHC-TCR interaction」、第45回日本免疫学会学術大会、2016年12月5日、沖縄

藤原 千春、山田 聡、村上 伸也、「FGF-2 inhibits CD40-mediated inflammatory response in periodontal ligament cells」、第145回日本歯科保存学会秋季学術大会、2016年10月28日、長野

藤原 千春、「Role of CD40 in immune response and periodontal inflammation」

International Symposium Tissue Regeneration and Immunology、2016年2月7日、Yonsei University College of Dentistry (Seoul, Korea)

藤原 千春、「Role of CD40 in immune response and periodontal inflammation」、International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases、2015年12月10日、大阪

藤原 千春、村上 伸也、Richard Hodes、「胸腺 B 細胞維持機構における CD40-CD40L 相互作用の重要性」、第 38 回日本分子生物学会年会、2015年12月1日、兵庫

藤原 千春、Richard Hodes、村上 伸也、「CD40-CD40L cognate interaction mediates maintenance of thymic B cells」、第 63 回国際歯科研究学会 (JADR) 学術大会、2015年10月31日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 千春 (FUJIHARA, Chiharu)
大阪大学・大学院歯学研究科・特任助教
(常勤)
研究者番号：00755358