

令和 5 年 5 月 20 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：2021～2022

課題番号：21K21062

研究課題名（和文）歯根膜細胞とセメント芽細胞間におけるCD40-CD40L相互作用の機能

研究課題名（英文）Function of CD40-CD40L interaction between periodontal ligament cells and cementoblasts

研究代表者

山本 優（Yamamoto, Yu）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80912211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯根膜細胞に恒常的に発現しているCD40と、そのリガンドであるセメント芽細胞上のCD40L分子の相互作用が咬合力等のメカニカルストレス負荷時の歯周組織のリモデリングにどのような役割を担うのかを解明することを目的としました。

GFP-CD40L発現ベクターを導入したヒトセメント芽細胞あるいはコントロールベクターを導入したヒトセメント芽細胞を、CD40陽性歯根膜細胞と共培養し検討しました。結果として、メカニカルストレス受容時の歯根膜において、CD40-CD40L相互作用は細胞の生存能・増殖能・分化能・細胞外基質産生能を向上させ、歯周組織の恒常性維持に關与していることが明らかとなりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究では、咬合力などのメカニカルストレスが歯周組織に負荷された際、どのような分子機構の働きにより歯周組織の恒常性が維持されているのかは十分に解明されていませんでした。

今回の研究においては、CD40-CD40Lの相互作用に着目し、模擬的にメカニカルストレスを付加した細胞を作成、実験に使用することで、同相互作用がメカニカルストレス負荷時に歯周組織において果たす役割について、その一端が明らかとなりました。

研究成果の概要（英文）：CD40 is constantly expressed on periodontal ligament cells, and its ligand, CD40L is expressed on cementoblasts. We investigated whether CD40-CD40L interaction played an important role in transducing mechanical stress between periodontal ligament cells and cementoblasts and remodeling the periodontal tissue for its homeostasis.

Human cementoblasts transfected with GFP-CD40L expression vector or control vector were co-cultured with CD40 positive periodontal ligament cells. The results showed that CD40-CD40L interaction enhances cell viability, proliferation, differentiation, and extracellular matrix production in the periodontal ligament during mechanical stress, and is involved in the maintenance of periodontal tissue homeostasis.

研究分野：歯学

キーワード：CD40 CD40L 歯周組織 リモデリング

1．研究開始当初の背景

歯周組織は、セメント質、歯根膜、歯槽骨、歯肉からなり、歯を支える中心的な役割を担っています。なかでも、歯と歯槽骨の間に存在する歯根膜は、生理的な状態では、咬合力などのメカニカルストレスを緩衝し、損傷した歯周組織を修復することで、同組織の恒常性維持に寄与しています。

これまでに、歯周組織において、CD40 分子が歯根膜細胞に恒常的に発現しており、咬合力などのメカニカルストレスが負荷された場合、その発現が上昇することが明らかになっています。しかしながら、生理的なメカニカルストレスによって歯根膜細胞に誘導される CD40 と、CD40 のリガンドであり、セメント芽細胞上に存在する CD40L が、どのような分子機構によりメカニカルストレス受容システムとして機能し、歯周組織の恒常性が維持されているのかは十分に解明されていませんでした。

2．研究の目的

本研究では、歯根膜細胞とセメント芽細胞の共培養実験や、マウスの臼歯に矯正力を付与する実験を行い、メカニカルストレスを受容して活性化される歯根膜細胞とセメント芽細胞間の CD40-CD40L 相互作用が、歯周組織のリモデリングに及ぼす機能について解明することを目的としました。

3．研究の方法

歯根膜細胞とセメント芽細胞の共培養実験による CD40-CD40L 相互作用の役割の検討を行うため、GFP-CD40L 発現ベクターをヒトセメント芽細胞に導入した GFP-CD40L-セメント芽細胞（GFP-CD40L-HCEM）あるいはコントロールベクターを導入した GFP-セメント芽細胞（GFP-HCEM）を、異なる石灰化能を持つ CD40 陽性歯根膜細胞と共培養することにより、

- (1) 生存能
 - (2) 増殖能
 - (3) 分化能
 - (4) 細胞外基質（ECM）産性能
- 以上四つの点について、解析を行いました。

4．研究成果

(1) 生存能
歯根膜細胞は複数の種類の細胞からなるヘテロな組織であり、本研究では石灰化能の異なる歯根膜細胞である歯根膜線維芽細胞（hPDF）および歯根膜幹細胞（hPDS）を実験に用いました。GFP-CD40L-HCEM と歯根膜細胞（hPDF または hPDS）を 10 : 1、2 : 1、1 : 1 の割合で共培養することにより、CD40-CD40L の相互作用を誘導しました。また、対照群として、GFP-HCEM とそれぞれの歯根膜細胞を共培養しました。48 時間後、PI 染色陽性の死細胞率を、フローサイトメーターを用いて検討しました。フローサイトメリー解析の結果、hPDF : HCEM を 10 : 1、あるいは 2 : 1 の比率で共培養すると、対照群と比較して、GFP-CD40L-HCEM と hPDF の共培養群において死細胞の割合が有意に低いことが明らかとなりました（図 1-A）。一方、hPDS と HCEM の共培養では、対照群と比較して、いずれの比率においても、死細胞の割合に変化を認めませんでした（図 1-B）。

以上の結果より、hPDF と HCEM 上の CD40-CD40L 相互作用は、メカニカルストレスに応答して細胞の生存能を向上させることが明らかとなりました。

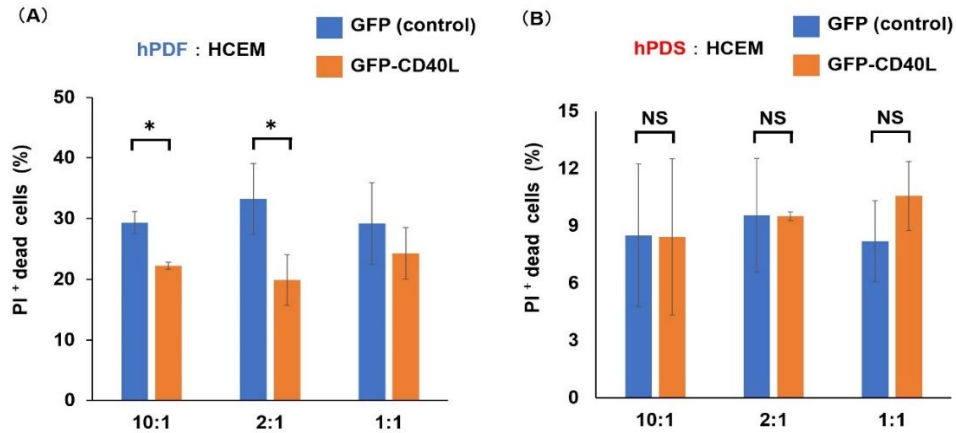


図1 歯根膜細胞のCD40とセメント芽細胞のCD40L間の相互作用が細胞毒性に及ぼす影響

(A) hPDFとHCEMを共培養した際のPI陽性細胞の割合

青：GFP-HCEM、橙：GFP-CD40L-HCEM

n = 3 ± 標準偏差 * $p < 0.05$

(B) hPDSとHCEMを共培養した際のPI陽性細胞の割合

青：GFP-HCEM、橙：GFP-CD40L-HCEM

n = 3 ± 標準偏差、NS=not significant

(2) 増殖能

次に、歯根膜細胞のCD40とセメント芽細胞のCD40L間の相互作用が細胞増殖能に及ぼす影響について検討するために、歯根膜細胞(hPDFまたはhPDS)と、GFP-CD40L-HCEMを2:1の割合で共培養し、48時間後にBrdUアッセイを行いました。対照群には、hPDFまたはhPDSと、GFP-HCEMを共培養した細胞を実験に用いました。BrdUアッセイの結果、対照群と比較して、GFP-CD40L-HCEMとhPDFを共培養すると、有意に細胞の増殖率が上昇することが明らかとなりました(図2-A)。一方、hPDSとHCEMを共培養した際の細胞増殖率については、両群で差を認めませんでした(図2-B)。

これらの結果より、hPDFとHCEM上のCD40-CD40Lの相互作用は、メカニカルストレスに応答して細胞の増殖能を向上させることが明らかとなりました。

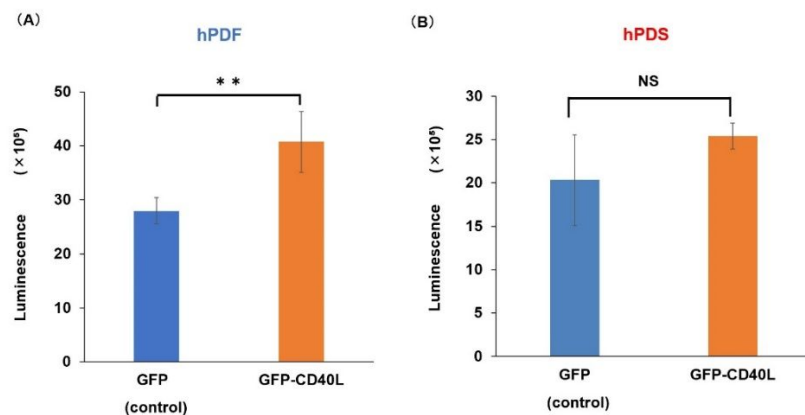


図2 歯根膜細胞のCD40とセメント芽細胞のCD40L間の相互作用が細胞増殖に与える影響

(A) hPDFとHCEMを共培養した際の細胞増殖能

青：GFP-HCEM、橙：GFP-CD40L-HCEM

n = 3 ± 標準偏差 ** $p < 0.01$

(B) hPDSとHCEMを共培養した際の細胞増殖能

青：GFP-HCEM、橙：GFP-CD40L-HCEM

n = 3 ± 標準偏差 NS=not significant

(3) 分化能

次に、歯根膜細胞のCD40とセメント芽細胞のCD40L間の相互作用が硬組織形成細胞への分化能に及ぼす影響を明らかにするために、歯根膜細胞とGFP-CD40L-HCEMを1:1、2:1、5:1、あるいは10:1の割合で共培養することにより、CD40-CD40Lの相互作用を誘導しました。また、対照群として、GFP-HCEMと歯根膜細胞を共培養しました。共培養72時間後、石灰化関連遺伝子(*RUNX2*、*ALP*)のmRNA発現を、Real-Time PCR法を用いて検討しました。

Real-Time PCR 解析の結果、分化能を持たない hPDF と GFP-CD40L-HCEM を共培養した場合は、いずれの割合で共培養しても、対照群と比較して、石灰化関連遺伝子である *RUNX2*、*ALP* mRNA 発現に変化を認めませんでした (図 3-A)。一方、対照群と比較して、hPDS と GFP-CD40L-HCEM を 2 : 1、5 : 1、あるいは 10 : 1 の割合で共培養した場合に、*RUNX2* および *ALP* の mRNA 発現が有意に上昇することが明らかとなりました。(図 3-B)

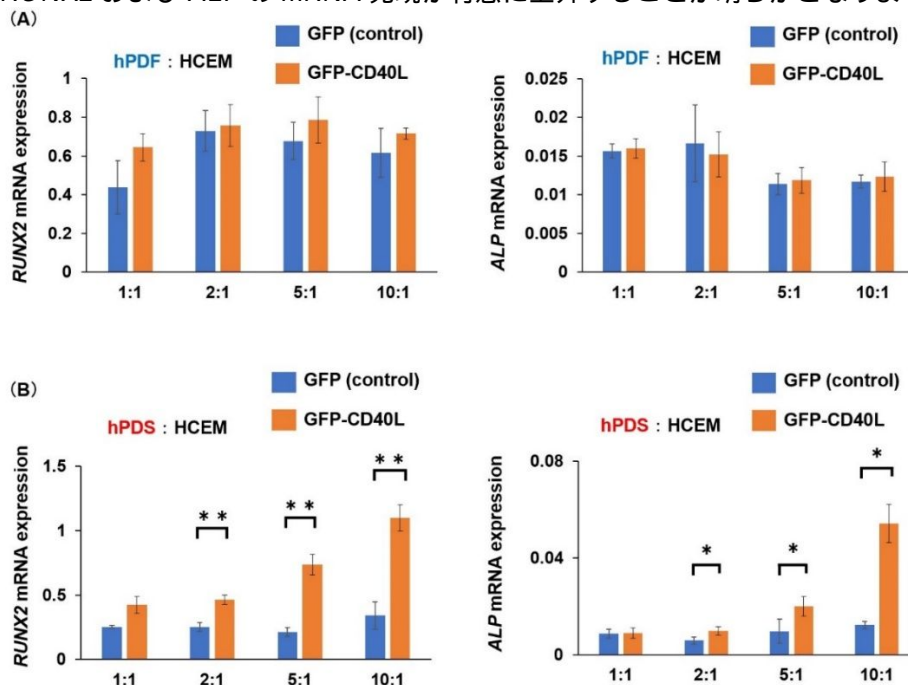
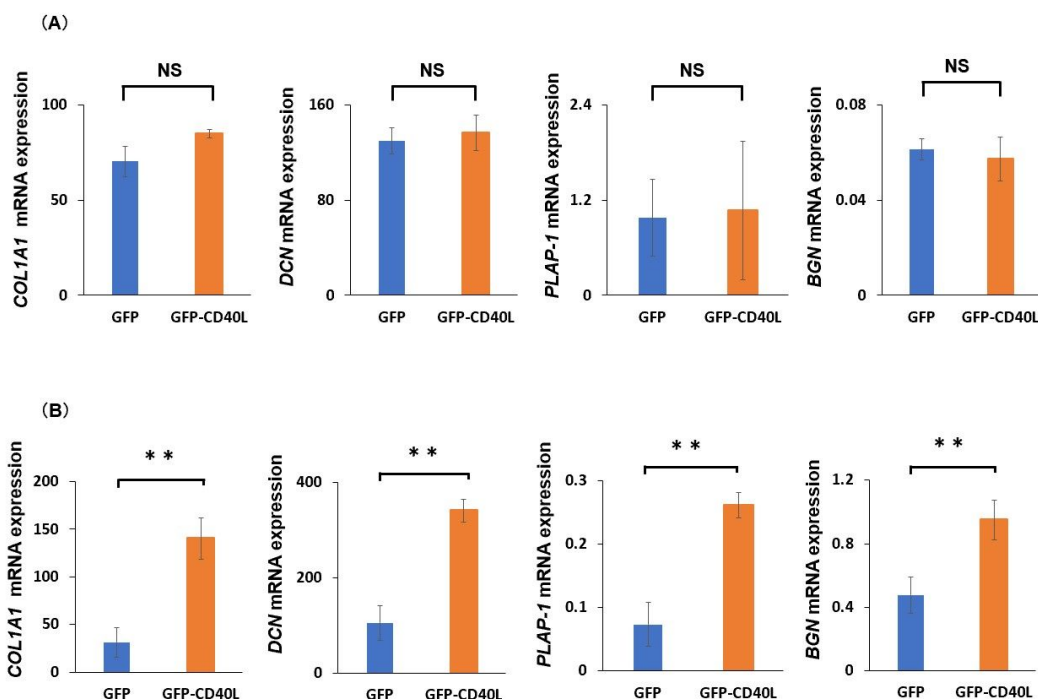


図 3 歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L 間の相互作用が硬組織形成細胞への分化能に与える影響

- (A) hPDF と HCEM を 1 : 1、2 : 1、5 : 1、あるいは 10 : 1 の比率で共培養した際の *RUNX2*、*ALP* の mRNA 発現を示す。青 : GFP-HCEM、橙 : GFP-CD40L-HCEM
n = 3 ± 標準偏差
- (B) hPDS と HCEM を 1 : 1、2 : 1、5 : 1、あるいは 10 : 1 の比率で共培養した際の *RUNX2*、*ALP* の mRNA 発現を示す。青 : GFP-HCEM、橙 : GFP-CD40L-HCEM
n = 3 ± 標準偏差 * $p < 0.05$ * * $p < 0.01$

(4) 細胞外基質 (ECM) 産生能

次に、歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L 間の相互作用が ECM 産生能に及ぼす影響について検討しました。まず、歯根膜細胞とセメント芽細胞を 10 : 1 の割合で共培養し、72 時間後の ECM 関連遺伝子 (*COL1A1*、*DCN*、*PLAP-1*、*BGN*) の mRNA 発現変化を Real-Time PCR 法を用いて解析しました。Real-Time PCR 解析の結果、hPDF と GFP-



CD40L-HCEM の共培養においては、対照群と比較して、ECM 関連遺伝子の mRNA 発現に変化を認めませんでした (図 4-A)。一方、hPDS と HCEM の共培養においては、対照群と比較して、GFP-CD40L-HCEM との共培養群において、*COL1A1*、*DCN*、*PLAP-1* 及び *BGN* mRNA 発現の有意な上昇を認めました。(図 4-B)。

図 4 歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L 間の相互作用が ECM 産生能に与える影響

- (A) hPDF と HCEM を 10 : 1 の割合で共培養した際の ECM 関連遺伝子の mRNA 発現
青 : GFP-HCEM、橙 : GFP-CD40L-HCEM
n = 3 ± 標準偏差 NS = not significant
- (B) hPDS と HCEM を 10 : 1 の比率で共培養した際の ECM 関連遺伝子の mRNA 発現
青 : GFP-HCEM、橙 : GFP-CD40L-HCEM
n = 3 ± 標準偏差 * * $p < 0.01$

以上の結果から、歯周組織において、咬合力のようなメカニカルストレスが負荷された場合、歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L の相互作用が誘導され、細胞の生存、増殖、及び硬組織形成細胞への分化を促進することにより歯周組織のリモデリングを促進することが示唆されました。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本優
2. 発表標題 メカニカルストレス誘導性CD40-CD40L相互作用の 歯周組織における機能解析
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------