

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17349

研究課題名(和文) CD40-CD40L相互作用に依存した歯周組織複合体活性化機構の解明

研究課題名(英文) Study of the interaction of CD40-CD40L in periodontal tissue

研究代表者

藤原 千春 (FUJIHARA, CHIHARU)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00755358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯にメカニカルストレスが付加された時に、歯周組織構成細胞上に誘導されるCD40-CD40リガンド(CD40L)の相互作用が、歯周組織にどのような機能を誘導し、骨のリモデリングを誘導するのかを検討することを目的として行われた。本研究の結果より、圧迫側では、歯根膜細胞と活性化T細胞がCD40-CD40Lを介して相互作用することで、歯周組織に炎症が誘導され、骨の吸収が起こることが示唆された。一方で、牽引側では、歯根膜細胞とセメント芽細胞がCD40-CD40Lを介して相互作用することで、歯根膜細胞の生存、増殖、骨芽細胞への分化を誘導し、骨の新生が起こることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メカニカルストレスによる圧迫刺激や伸展刺激存在下において、歯根膜に存在する細胞が、どのような分子機構で、歯周組織に存在する多様な細胞と細胞間コミュニケーションを行い、同組織のリモデリングを誘導するのかわりに関しては未だ不明な点が多かった。本研究の成果より、歯根膜細胞に恒常的に発現しているCD40分子が他の歯周組織構成細胞(遊走してくる活性化T細胞や組織に存在するセメント芽細胞)のCD40Lと相互作用することで、歯周組織の炎症やリモデリングを制御し、同組織の恒常性維持を担うことが示唆された。本研究により、CD40-CD40L相互作用が、歯周組織恒常性維持機構の一端を担うことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the mechanisms how the interaction of CD40-CD40 ligand (CD40L) between periodontal ligament cells and the other periodontal tissue cells induces the remodeling of the periodontal tissue under mechanical stress. As the results of this study, it is suggested that the interaction between periodontal ligament cells and activated T cells via CD40-CD40L induces periodontal inflammation, resulting in resorption of the alveolar bone on the compression side. On the other hand, on the tensile side, the interaction between periodontal ligament cells and cementoblasts via CD40-CD40L induce the survival, proliferation, and differentiation into osteoblasts, resulting in the formation of alveolar bone.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜細胞 セメント芽細胞 炎症反応 CD40-CD40L相互作用 メカニカルストレス 骨リモデリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

歯周組織は、歯根膜細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞といった歯周組織を構成する間葉系の細胞群に加えて、歯周組織の炎症時にリンパ節から遊走してくる免疫細胞や破骨細胞といった造血系細胞によって構成されている。歯周組織を構成する、歯根膜は、歯の表面にあるセメント質と歯槽骨の間に介在し、歯に咬合力や矯正力が加わった場合に、同組織にメカニカルストレスによるシグナルを伝達する中心的な役目を担っている。しかしながら、メカニカルストレスによる圧迫刺激や伸展刺激存在下において、歯根膜に存在する細胞が、いかなる分子機構により、歯周組織に存在する多様な細胞と細胞間コミュニケーションを行い、同組織に骨リモデリングの変化を誘導するののかに関しては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、歯根膜細胞に恒常的に発現している CD40 分子に着目し、同細胞が CD40 分子を介して他の歯周組織構成細胞とどのようなネットワークを形成して、歯周組織の恒常性維持を担うのかについて検討することを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究は、歯にメカニカルストレスが負荷されることによって、歯周組織構成細胞上に誘導される CD40-CD40 リガンド (CD40L) の相互作用が歯周組織にどのような機能を誘導し、歯槽骨のリモデリングを誘導するののかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

① 圧迫側における歯根膜細胞の CD40 分子の機能

(1) CD40L 刺激による NFκB2 シグナルの誘導

マウス歯根膜細胞 (MPDL22) を CD40L (1μg/ml) で刺激し、時間経過で上昇する p52 のリン酸化を western blot にて検討した。

(2) CD40L 刺激による炎症性サイトカインの測定

MPDL22 を CD40L (1μg/ml) で刺激し、IL-6 と TNF-α 産生量を ELISA で検討した。

(3) 破骨細胞特異的 CD40 コンディショナルノックアウトマウスの作成

CD40<sup>flox</sup> マウスと RANKCre マウスを交配することで、破骨細胞特異的 CD40 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、骨代謝への影響をマイクロ CT にて検討した。

② 牽引速における歯根膜細胞の CD40 分子の機能

(1) 伸展刺激付与によるヒトセメント芽細胞の CD40L 発現を検討

細胞伸展器 (シェルバ) を用いて、ヒトセメント芽細胞株 (HCEM) に伸展刺激を付与し、CD40L のタンパク発現をフローサイトメータ (FACS) にて検討した。

(2) HCEM への CD40L 遺伝子の導入

Neon Transfection system を用いて、エレクトロポレーションを行い、HCEM に EGFP-hCD40L ベクターを導入した。導入後の CD40L の発現をマイクロスコープおよびリアルタイム PCR にて検討した。

(3) ヒト歯根膜細胞 (HPDL) と hCD40-HCEM 共培養

異なる割合で、hCD40 を遺伝子導入した hCD40-HCEM 株と HPDL を共培養し、共培養に適切な割合を PI 染色 FACS 解析にて検討した。

(4) hCD40L-HCEM と HPDL 共培養による細胞増殖への影響

(3) の条件で HCEM と HPDL を共培養した後、BrdU アッセイを行い、CD40-CD40L 相互作用による増殖能への影響を検討した。

(5) hCD40L-HCEM と HPDL 共培養による細胞外基質産生への影響

(3) の条件で HCEM と HPDL を共培養した後、細胞外基質の発現をリアルタイム PCR にて検討し、CD40-CD40L 相互作用による細胞外基質産生能への影響を検討した。

(6) hCD40L-HCEM と HPDL 共培養による骨芽細胞への分化の影響

(3) の条件で HCEM と HPDL を共培養した後、骨芽細胞分化関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR にて検討し、CD40-CD40L 相互作用による細胞外基質産生能への影響を検討した。

(7) 歯根膜組織に発現する遺伝子変化

歯根膜組織に発現する遺伝子変化をマイクロアレイ解析にて検討した。

## 4. 研究成果

① 圧迫側における歯根膜細胞の CD40 分子の機能

CD40 のリガンドである CD40L は主に活性化した T 細胞上に発現を認めることが知られている。歯根膜に矯正力を付加すると、圧迫側においては、血管の充血や免疫細胞の誘導が起こり、活性化 T 細胞の浸潤を認める。そこで、これら T 細胞の CD40L と歯根膜細胞の CD40 分子が相互作用することで誘導される機能を検討することとした。

(1) CD40L 刺激による NFκB2 シグナルの誘導

マウス歯根膜細胞 (MPDL22) を CD40L (1μg/ml) で刺激すると NFκB2 シグナルの p52 のリン酸化を認めた。

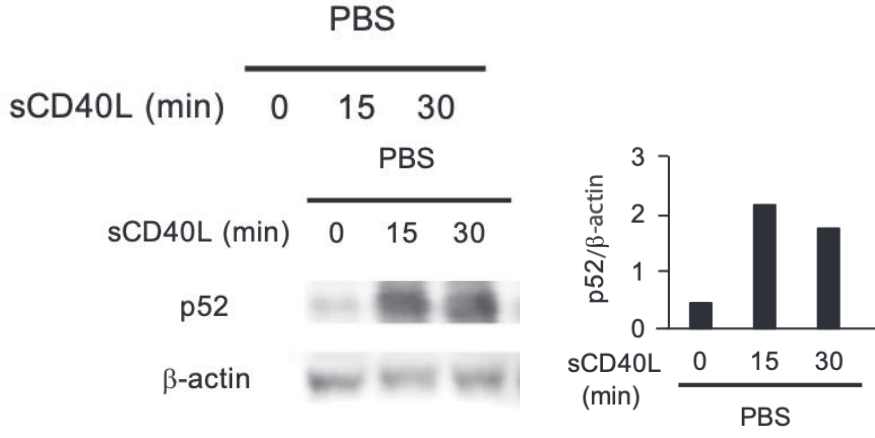


図1 sCD40L 刺激による MPDL22 の p52 リン酸化  
 左:ウェスタンブロットの結果 右:左のバンド intensity の計測値

(2) CD40L 刺激による MPDL22 の炎症性サイトカイン測定  
 MPDL22 を CD40L (1μg/ml) で刺激すると、IL-6 と TNF-a 産生量が増加した。

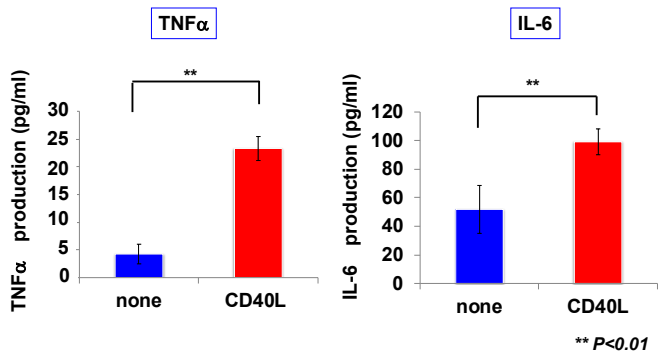


図2 sCD40L 刺激による MPDL22 からの炎症性サイトカインの産生量

(3) 破骨細胞特異的 CD40 コンディショナルノックアウトマウスの作成  
 歯周組織の炎症時に増加する破骨細胞上にも、CD40 の発現を認める。そこで、破骨細胞特異的 CD40 コンディショナルノックアウトマウス (cKO) を作成し、CD40-CD40L 相互作用が骨吸収に及ぼす影響を検討したところ、破骨細胞特異的 CD40cKO では、マウスの骨密度の増加を認めた。

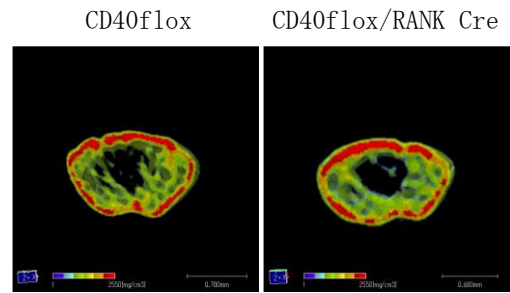


図3 マウス大腿骨 CT 像断面図

② 牽引速における歯根膜細胞の CD40 分子の機能  
 (1) 伸展刺激付与によるヒトセメント芽細胞の CD40L 発現を検討  
 伸展刺激 10%, 0.5Hz, 72 時間で HCEM に伸展刺激を付加すると、CD40L の発現を認めた。

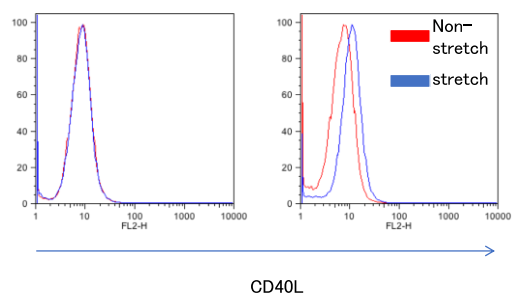


図4:伸展刺激の有無による HCEM の CD40L タンパク発現  
 赤:non-stretch  
 青:stretch

(2) HCEM への CD40L 遺伝子の導入

EGFP-CD40L HCEM 遺伝子導入株において、EGFP 発現の確認、CD40L mRNA 発現上昇を確認した。

(3) ヒト歯根膜細胞 (HPDL) と hCD40-HCEM 共培養

HPDL:HCEM=1:0.5-10 の間で条件検討を行い、PI 染色を行ったところ、いずれの条件でも細胞死に影響はなかった。加えて、control ベクター導入 HCEM (GFP) と比較して、CD40L 遺伝子導入 HCEM (GFP-CD40L) において、PI 陽性細胞数の減少、すなわち、細胞の生存率が上昇することが明らかとなった。

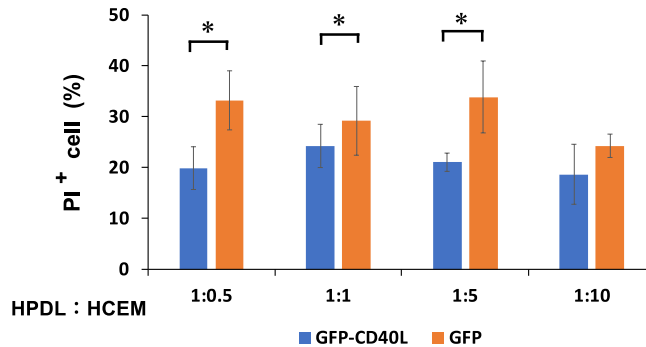


図5 HPDL と CD40L 導入 HCEM 共培養における細胞生存能

(4) hCD40L-HCEM と HPDL 共培養による細胞増殖への影響

HPDL:HCEM=1:0.5 で共培養を行い、BrdU アッセイを行った結果、control ベクター導入 HCEM と比較して、CD40L 遺伝子導入 HCEM において、細胞の増殖率が上昇することが明らかとなった。

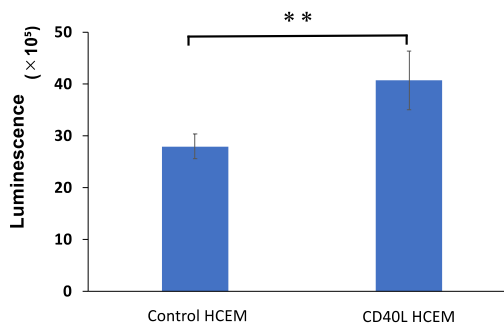


図6 HPDL と CD40L 導入 HCEM 共培養における細胞増殖能

(5) hCD40L-HCEM と HPDL 共培養による細胞外基質産生への影響

HPDL と HCEM の共培養を行い、細胞外基質 periostin, I 型コラーゲンの mRNA 発現リアルタイム PCR にて検討したところ、control ベクター導入 HCEM と比較して、CD40L 遺伝子導入 HCEM において、これらの遺伝子発現に明らかな差を認めなかった。

(6) hCD40L-HCEM と HPDL 共培養による骨芽細胞への分化への影響

HPDL と HCEM の共培養を行い、ALP, RUNX2 と OC の mRNA 発現のリアルタイム PCR にて検討したところ、control ベクター導入 HCEM と比較して、CD40L 遺伝子導入 HCEM において、ALP と OC の遺伝子発現の上昇を認めた。RUNX2 の発現には大きな差を認めなかった。

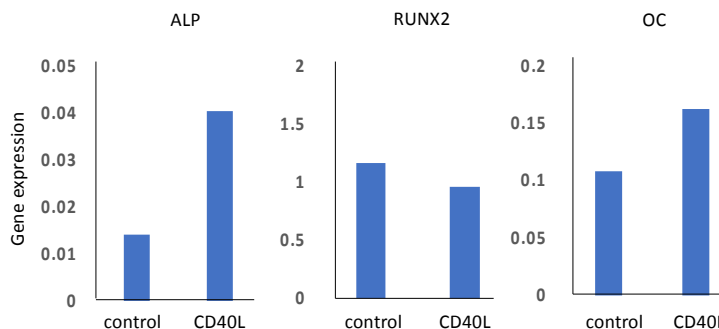


図7 HPDL と CD40L 導入 HCEM 共培養による硬組織形成細胞への分化関連遺伝子の発現

#### (7) 歯根膜組織のマイクロアレイ解析

22000 個の遺伝子のうち、1049 個の遺伝子は発現上昇、565 個の遺伝子の発現低下を認めた。

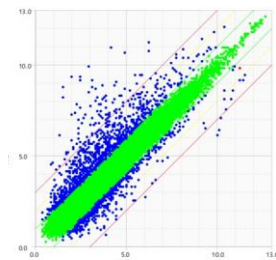


図8 マイクロアレイ解析結果プロット図

以上より、圧迫側では、歯根膜細胞と活性化T細胞がCD40-CD40Lを介して相互作用することで、炎症が誘導され歯槽骨吸収が起こることが示唆された。一方で、牽引側では、歯根膜細胞とセメント芽細胞がCD40-CD40Lを介して相互作用することで、歯根膜細胞の生存、増殖、骨芽細胞への分化を誘導することで、歯槽骨の添加が起こることが示唆された。今後は、破骨細胞特異的CD40cKOマウス及び骨芽細胞特異的(Collagen typeI Cre) CD40cKOの解析を進めることで、*in vivo*でより詳細な検討を行っていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. **C. Fujihara**, Y. Kanai, R. Masumoto, J. Kitagaki, M. Matsumoto, S. Yamada, T. Kajikawa, S. Murakami, Fibroblast growth factor-2 inhibits CD40-mediated periodontal inflammation, *J Cell Physiol.*, May 2019, 234(5) 7149-7160 (査読あり)

2. R. Masumoto, J. Kitagaki, **C. Fujihara**, M. Matsumoto, S. Miyauchi, Y. Asano, A. Imai, K. Kobayashi, A. Nakaya, M. Yamashita, S. Yamada, M. Kitamura, S. Murakami, Response to “Identification of genetic risk factors of aggressive periodontitis using genomewide association studies in association with those of chronic periodontitis.”, *J Periodontol Res.*, 2019, jre. 12652, **In Press** (査読なし)

3. R. Masumoto, J. Kitagaki, **C. Fujihara\***, M. Matsumoto, S. Miyauchi, Y. Asano, A. Imai, K. Kobayashi, A. Nakaya, M. Yamashita, S. Yamada, M. Kitamura, S. Murakami, Identification of genetic risk factors of aggressive periodontitis using genomewide association studies in association with those of chronic periodontitis, *J Periodontol Res.*, 2018, jre. 12620, **In Press** (\* corresponding author) (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

1. 歯周組織再生過程におけるFGF-2の炎症抑制作用  
藤原千春、金井 優、榎本梨沙、松本昌大、村上伸也  
第四回日本骨免疫学会ウィンターセミナー 2019年1月25日

2. FGF-2 suppressed CD40-mediated inflammation in periodontal ligament cells  
**C. Fujihara**, Y. Kanai, S. Murakami,  
96th General Session and Exhibition of the IADR 2018年7月27日

3. B細胞特異的CD40分子が骨恒常性維持機構に及ぼす影響  
藤原千春、金井 優、北垣次郎太、山田 聡、村上伸也  
日本歯科保存学会春季学術大会(第148回) 2018年6月15日

4. 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用いた骨代謝機能解析  
藤原千春、金井 優、北垣次郎太、山田 聡、村上伸也  
第三回日本骨免疫学会ウィンターセミナー 2018年1月26日

5. 歯根膜細胞における歯周組織再生誘導剤FGF-2のCD40発現抑制による抗炎症作用  
藤原千春、山田 聡、北垣次郎太、村上伸也  
第39回日本炎症・再生医学会 2017年7月18日

6. CD40分子が誘導するダイナミックな生体機能-全身における免疫機能制御から歯周組織にお

ける局所の炎症反応・骨代謝制御まで

藤原千春

第 60 回春季日本歯周病学会学術大会 2017 年 5 月 12 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。