

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792028

研究課題名(和文) IL-11を用いた歯根膜組織再生の解析

研究課題名(英文) The analyses of interleukin-11 on the regeneration of periodontal ligament tissues

研究代表者

門野内 聡 (Monnouchi, Satoshi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30609558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯根膜幹細胞において、機械的負荷はアンジオテンシンIIやAT2がIL-11を調節することにより、細胞増殖活性を調節し、また骨芽細胞あるいはセメント芽細胞分化への誘導能にも関与していることが示唆された。

今回の研究成果は、歯根膜組織における恒常性の調節機構に関して新たな知見を獲得しただけでなく、IL-11が歯根膜組織再生に及ぼす影響に関する情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Positive interleukin-11 (IL-11) staining was observed in the periodontal ligament (PDL) of rat maxillae and in cultures of the human primary PDL cells (HPDLCs). In HPDLCs exposed to stretch, gene and protein expression of IL-11 were up-regulated concomitant with an increase in angiotensin II (Ang II) and via AT2, Ang II receptor. Recombinant human IL-11 (rhIL-11) increased mRNA expression of the cementoblast-specific marker, CP-23, and the osteoblastic markers and promoted proliferation in human PDL progenitor cells (cell line 1-17). In addition, rhIL-11 also increased the degree of mineralized nodule formation in cell line 1-17 cultures treated with CaCl₂.

Mechanical loading appears to control proliferation and osteo/cementoblastic differentiation of human PDL stem/progenitor cells through IL-11 regulation of Ang II and AT2.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療歯学

キーワード：interleukin-11 mechanical stress periodontal ligament

1. 研究開始当初の背景

日常的に咬合力が負荷されている歯根膜組織において、その恒常性の維持には適度のメカニカルストレスが、重要な働きを果たしていると考えられている。その一方で、破骨細胞形成を促進するような過度のメカニカルストレスは、歯根吸収を惹起することが報告されている(Yamaguchi et al. J Dent Res, 2006)。そこで申請者は、破骨細胞形成促進因子である RANKL の発現を誘導しない程度の伸展力を適度の負荷と設定し、この条件を用いてヒト歯根膜細胞に負荷を与えた結果、angiotensin II のシグナル経路を介して、TGF- β 1 および ALP の遺伝子発現が促進することを報告した (Monnouchi et al. J Dent Res, 2011)。また最近申請者は、同条件下で刺激されたヒト歯根膜細胞において IL-11 の発現が促進することを明らかにした。さらに、その IL-11 の局在は、ラットの歯周組織において歯根膜組織全体に認められ、特に歯槽骨およびセメント質側では強発現することを報告した(第 134 回日本歯科保存学会にて発表)。

IL-11 は、線維芽細胞や骨芽細胞など多くの種類の細胞から分泌されるサイトカインの一つであり、骨芽細胞や破骨細胞を介した骨代謝の調節に関与していることが報告されている (Du et al. Blood, 1997)。IL-11 を過剰発現させたマウスでは、骨量が増加し、経年的な骨吸収が抑制される結果が報告されており (Takeuchi et al. J Biol Chem, 2002)、近年には、IL-11 がヒト歯根膜細胞の骨芽細胞への分化を促進する可能性が示唆された (Leon et al. J Periodont Res, 2007)。一方、メカニカルストレスによって誘導された IL-11 は、マウスの骨芽細胞分化を促進させるとの報告がなされている (Kido et al. Bone, 2009)。これらの報告から、ヒト歯根膜組織において、咬合力によって発現が促進した IL-11 が骨代謝やセメント質代謝に影響することにより、歯根膜組織の維持や強化に働いていることが推察された。

2. 研究の目的

本研究では、メカニカルストレスが負荷されたヒト歯根膜細胞における IL-11 のシグナル経路を解析し、細胞外に分泌された IL-11 が骨代謝、セメント質代謝に及ぼす影響について解明することを目的とした。今回の研究の結果から、歯根膜組織の恒常性の調節機構に与える IL-11 の影響について新たな知見を得ることが可能であり、さらに IL-11 が歯根膜組織の再生に及ぼす影響についても明らかにすることができると考えている。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

健康な患者の歯根膜組織から採取したヒト歯根膜細胞を HPDLCs (HPDL-2D, HPDLC-2E, HPDLC-3M) と名づけた。HPDLC は、5-7 継代後、

実験に用いた。

さらにヒト歯根膜幹細胞の幹細胞株として、以前論文報告をした 1-17 細胞を実験に使用した。この細胞株は、歯根膜の特徴を有し、骨芽細胞、脂肪細胞、あるいは軟骨細胞にも分化できることが報告されている。

石灰化機能実験のネガティブコントロールとして、ヒト歯肉線維芽細胞が使用された。

(2) 伸展力の負荷

細胞は、type I collagen にコーティングされたシリコンチャンパーに播種し、細胞伸展装置 (STB-140, STREX Co., Osaka) を用いて伸展力を負荷する。伸展条件 (8%, 1Hz, 1hour) は、私が以前報告した条件に準じて行った (Monnouchi et al. J Dent Res, 2011)。

(3) siRNA 導入

AT2 を標的とした siRNA、およびネガティブコントロールを Sigma-Aldrich より購入し、Lipofectamine (Invitrogen) を用いて HPDLC に導入した。導入細胞を次の日にシリコンチャンパーに播種し、2 日後に伸展刺激を行った。

(4) 遺伝子およびタンパク発現解析

定量的 RT-PCR 法を用いて遺伝子発現の解析を行った。タンパク発現解析においては、ELISA 法、および免疫組織/細胞化学的染色法を採用した。

4. 研究成果

(1) ラット歯根膜組織および培養ヒト歯根膜細胞における IL-11 の局在

IL-11 抗体を用いた免疫組織学的解析において、ラット歯根膜組織に強く陽性反応が認められた。一方で、周囲組織の骨やセメント質、歯髄には認められなかった。

IL-11 抗体を用いた免疫細胞学的解析では、ヒト歯根膜細胞 (HPDLC) の細胞質内に陽性反応が認められた。

(2) 伸展力が負加された HPDLC における IL-11 の発現上昇

伸展刺激を 1 時間与えた HPDLC において、IL-11 の発現がコントロールと比較して上昇した。さらに、伸展刺激を 1 時間与えた HPDLC から得た培養上清においても、IL-11 のタンパク発現の上昇が認められた (図 1)。

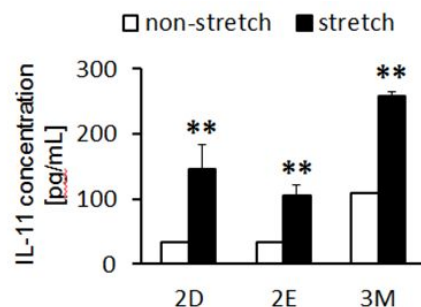


図1: 伸展力が負荷された HPDLCs (2D, 2E, 3M)における IL-11 のタンパク発現

(3)アンジオテンシン II 経路を介した IL-11 発現の調節

伸展力が負荷された HPDLC においてアンジオテンシン II (Ang II) の発現が上昇し, Ang II のレセプターである AT2 の活性を介して、歯根膜関連遺伝子の発現の増加も同時に認められたことを、最近私達が報告した。そこでリコンビナント Ang II タンパクを HPDLC に刺激した結果、IL-11 の遺伝子発現が促進した。さらに、伸展力によって上昇した IL-11 の発現上昇は、AT2 アンタゴニストを HPDLC に前処理することにより抑制された。しかしその一方で、AT1 アンタゴニストの処理では同様の変化は認められなかった。この結果における AT2 の役割を確かめるため、siRNA を用いて HPDLC における AT2 の発現をノックダウンした。siRNA を導入した HPDLC では、スクランブル siRNA 導入細胞と比較して、AT2 の遺伝子発現が抑制された。また、伸展刺激で上昇した IL-11 の遺伝子発現も AT2 の siRNA により抑制された (図2)。

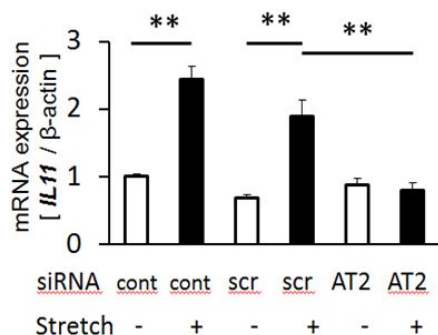


図2: AT2 の siRNA が導入された HPDLC における IL-11 の遺伝子発現

(4)1-17 細胞におけるリコンビナント IL-11 の影響

ヒト歯根膜幹細胞における IL-11 の影響を調べるため、1-17 細胞を用いて実験を行った。最初に、1-17 細胞において IL-11 のレセプターである IL-11 receptor alpha および gp130 の遺伝子発現を確認した。次に、リコンビナント IL-11 タンパクで 1-17 細胞に刺激した結果、BSP、OPN、および CP-23 の遺伝子発現の上昇が認められた (図3)。

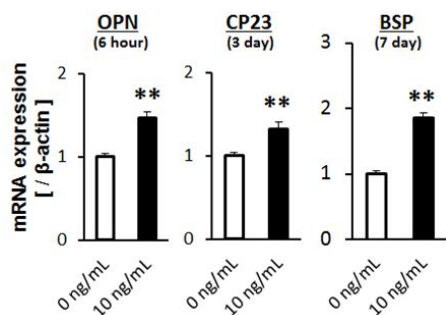


図3: リコンビナント IL-11 で刺激された 1-17 細胞における遺伝子発現

さらに、リコンビナント IL-11 の刺激は、1-17 細胞の細胞増殖活性も誘導した (図4)。

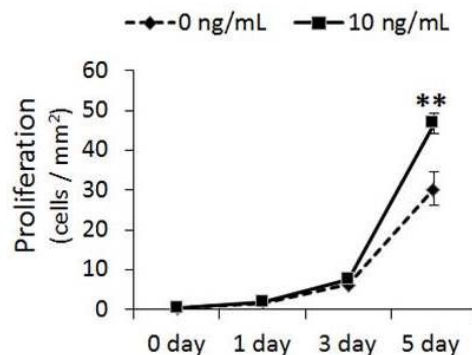


図4: リコンビナント IL-11 で刺激された 1-17 細胞における細胞増殖活性

アリザリンレッド染色を用いた石灰化機能解析の結果、塩化カルシウム入りの培地で 1-17 細胞を培養し、リコンビナント IL-11 を刺激した結果、石灰化沈殿物の生成が促進された (図5)。一方で、同様の条件でヒト歯肉線維芽細胞に刺激を与えた結果、アリザリンレッド染色に陽性反応はほとんど認められなかった。

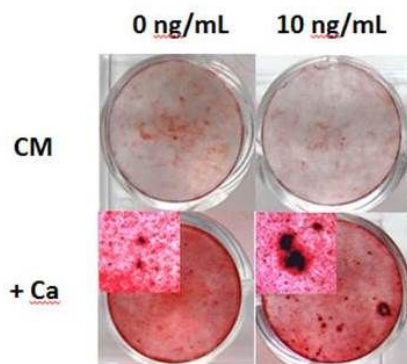


図5: リコンビナント IL-11 で刺激された 1-17 細胞における石灰化機能解析

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)

[雑誌論文](計2件)

Monnouchi S, Maeda H, Yuda A, Hamano S, Wada N, Tomokiyo A, Koori K, Sugii H, Serita S, Akamine A. Mechanical induction of interleukin-11 regulates osteoblastic/cementoblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cells. J Periodontal Res, 査読有, in press. DOI:10.1111/jre.12200

Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Monnouchi S, Akamine A. Prospective potency of TGF- 1 on maintenance and regeneration of periodontal tissue. Int Rev Cell Mol Biol, 査読有, 304: 283-367, 2013.

[学会発表](計2件)

Monnouchi S, Maeda H, Wada N, Akamine A.
Stretched periodontal ligament cells
up-regulate Interleukin-11 to regulate
osteoblastic metabolism. The 59th Annual
Meeting of Japanese Association for
Dental Research (JADR), Hiroshima,
October 8-9, 2011.

門野内 聡、前田 英史、山本 直秀、藤
井慎介、友清 淳、和田 尚久、河野 清
美、郡 勝明、寺松 陽子、赤峰 昭文；
ヒト歯根膜細胞への伸展刺激は
Interleukin-11 の発現を促進する、第 134
回日本歯科保存学会春季学術大会、浦安
(東京) 2011 年 6 月 9-10 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門野内 聡 (MONNOUCHI Satoshi)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：30609558

(2) 研究分担者

前田 英史 (MAEDA Hidefumi)
九州大学病院・講師
研究者番号：10284514

和田 尚久 (WADA Naohisa)
九州大学病院・講師
研究者番号：60380466

赤峰 昭文 (AKAMINE Akifumi)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：00117053