

Title	歯周組織におけるCD40-CD40L相互作用の機能
Author(s)	山本, 優
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/82166">https://doi.org/10.18910/82166</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 山本 優 )

論文題名 歯周組織におけるCD40-CD40L相互作用の機能

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

Cluster of differentiation 40 (CD40) は、腫瘍壊死因子受容体ファミリーに属する膜貫通型タンパク受容体で、歯周組織において歯根膜細胞に恒常的に発現していること、そして、炎症歯周組織においては歯根膜細胞のCD40の発現が著しく上昇することが明らかとなっている。これらCD40陽性歯根膜細胞が、炎症局所に浸潤するCD40 Ligand (CD40L) 陽性免疫細胞と相互に作用することで、同部の炎症反応を修飾する可能性が考えられるが、その詳細については未だ明らかではない。一方、正常歯周組織においては、咬合力のような生理的メカニカルストレスが負荷された場合に、歯根膜細胞上のCD40の発現が上昇するということが明らかになっている。しかしながら、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が、歯周組織にどのような影響を及ぼすのかについては、未だ明らかではない。

そこで、歯周組織におけるCD40-CD40Lの相互作用がどのような生物学的機能を担うのかについて、歯周炎のような病態時、及びメカニカルストレスが付与された状態の2つの観点から解明することを目的とし、本研究を行った。

## 【材料および方法】

- ① 歯周病炎症惹起因子を用いたマウス歯根膜細胞の刺激  
0.1% Fetal calf serum (FCS) 含有  $\alpha$  変法イーグル最小必須培地 ( $\alpha$ -MEM) 存在下で、マウス歯根膜細胞 (MPDL22) に対し0.02 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 及び 1 ng/ml Interleukin-1 (IL-1 $\beta$ )、10  $\mu$ g/ml *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) 菌由来Lipopolysaccharide (LPS) にて24時間刺激した後、同細胞におけるCD40 mRNA 発現変化をReal-Time PCR法を用いて検討した。
- ② soluble CD40L (sCD40L) 刺激によるMPDL22からの炎症性サイトカイン産生の検討  
MPDL22を1  $\mu$ g/mlのsCD40Lで刺激し、8時間後および72時間後に、培養上清中に含まれるTumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) またはInterleukin-6 (IL-6) の産生量をEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 解析にて測定した。
- ③ マウス創傷治癒モデルを用いたCD40Lの炎症増悪への関与についての検討  
8~12週齢のオスのBALB/cマウスを用いて創傷治癒モデルを作製した。マウスの背部に直径1.6 cmの円形の傷を全層皮膚切除することで作成し、5  $\mu$ gのsCD40Lを創傷面に均一に塗布し、創傷部をBioclusive創傷被覆材にて覆った。対照群には、sCD40Lと等量のPBSを塗布した。被覆材は2~3日ごとに交換し、創傷7日目の傷の面積を、透明シートを用いて計測した。さらに、7日目の創傷部皮膚組織の凍結切片またはパラフィン切片を作成し、HE染色および蛍光免疫染色を行うことにより、創傷部の炎症状態について組織学的解析を行った。
- ④ マウスの第一臼歯近心移動モデルを用いた歯周組織におけるCD40L局在の検討  
12週齢オスのC57BL/6Jマウスを用いてマウス第一臼歯の近心移動を行った。マウスの上顎前歯歯槽骨と上顎左側第一臼歯間にニッケルチタン製のクローズドコイルスプリングを設置し、直径0.01 mmのスチールワイヤーにて固定した。10 gの力を上顎左側第一臼歯に12日間加えることで、当該歯を近心方向に移動させた。矯正力を付与していない上顎右側第一臼歯を対照群とした。矯正負荷12日目に、マウスを屠殺し、上顎骨水平断にてパラフィン切片を作成して、免疫組織染色法によりCD40Lの局在を検討した。
- ⑤ *in vitro* 培養細胞伸展法によるCD40およびCD40L発現の検討  
培養細胞伸展システム「Shellpa®」を用いて、ヒトセメント芽細胞に対し、0.5 Hz、10%の伸展力で24~72時間伸展刺激を加えた。同様の方法で、ヒト歯根膜細胞に72時間伸展刺激を加えた。刺激後、CD40もしくはCD40Lタ

ンパクレベルの発現をフローサイトメトリーにより解析した。

⑥ GFP-CD40L遺伝子導入ヒトセメント芽細胞 (HCEM) もしくはOFP-CD40遺伝子導入ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDF) の作成

遺伝子導入システムNeon<sup>®</sup>を用いて、エレクトロポレーション法にて細胞に遺伝子導入を行った。1,100 Voltage、20 Width、1 pulseの条件下にて、Green Fluorescent Protein (GFP) 発現ベクターもしくはGFP-CD40L発現ベクターをHCEMに遺伝子導入した。同様の方法で、hPDFへのOrange Fluorescent Protein (OFP) 発現ベクターもしくはOFP-CD40発現ベクターの遺伝子導入を行った。遺伝子導入後の細胞におけるGFPおよびCD40L、もしくはOFPおよびCD40のタンパクレベルをフローサイトメトリー解析にて検討した。

⑦ ヒト歯根膜細胞およびGFP-CD40L遺伝子導入ヒトセメント芽細胞の共培養によるCD40-CD40L相互作用の機能解析

硬組織形成細胞への分化能を有するヒト歯根膜幹細胞 (hPDS)、もしくは分化能を持たないヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDF) を用いた。これらの細胞とGFP-CD40L遺伝子導入HCEMを共培養し、ヨウ化プロビジウム (PI) 染色にて細胞毒性を、BrdUアッセイにて細胞増殖を、硬組織形成細胞への分化能と細胞外マトリックス (ECM) 産生能についてReal-Time PCR法にて検討した。

⑧ OFP-CD40遺伝子導入hPDFおよびGFP-CD40L遺伝子導入HCEMの共培養によるRUNX2 mRNA発現変化の検討  
OFP-CD40遺伝子導入hPDFを、GFPもしくはGFP-CD40L発現HCEMと共培養し、72時間後、RUNX2のmRNA発現変化をReal-Time PCR法を用いて検討した。

#### 【結果】

- ① IL-1 $\beta$  またはLPSでMPDL22を刺激すると、対照群と比較して、CD40 mRNA発現が有意に上昇することが明らかとなった。
- ② MPDL22をsCD40Lにて刺激すると、TNF- $\alpha$ およびIL-6の産生が有意に上昇した。
- ③ マウス創傷治癒モデルの創傷7日目において、対照群のPBS投与群と比較して、CD40L投与群は傷の面積が有意に広いことが明らかとなった。さらに、術後7日目のHE染色像より、CD40L投与群では、免疫細胞の凝集と少数の線維芽細胞を伴う肥大上皮および潰瘍が観察された。一方、PBS投与群では、創傷表面に新しい上皮の伸長が観察された。蛍光免疫染色により、CD40L投与群では、創傷部にLy6G陽性好中球およびF4/80陽性マクロファージの浸潤を認めた。
- ④ 第一臼歯近心移動実験開始から12日目における上顎骨歯周組織の免疫染色の結果、牽引側では、セメント質表面に存在する細胞に抗CD40L抗体の濃染を認めた。
- ⑤ *in vitro* メカニカルストレス付与により、セメント芽細胞は48時間以後にCD40L発現が上昇した。一方、歯根膜細胞では、メカニカルストレス付与によりCD40発現の上昇を認めたが、CD40Lの発現に変化はなかった。
- ⑥ GFP遺伝子導入HCEMおよびGFP-CD40L遺伝子導入HCEMでGFPの等しい発現を認めた一方、GFP-CD40L遺伝子導入HCEMで有意に高いCD40Lの発現を認めた。また、OFPのタンパク発現はOFP導入群と比較してOFP-CD40導入hPDFで有意に低い発現を認めたが、CD40のタンパク発現はOFP導入群と比較してOFP-CD40導入hPDFにおいて有意に高い発現を示した。すなわち、GFP-CD40L遺伝子導入HCEM及びOFP-CD40遺伝子導入hPDFの樹立に成功した。
- ⑦ GFP-CD40L遺伝子導入HCEMとhPDFを共培養すると、PI陽性死細胞の割合が有意に低下し、細胞増殖が促進することが明らかとなった。一方、hPDSとGFP-CD40L遺伝子導入HCEMを共培養すると、石灰化関連遺伝子及び細胞外マトリックス関連遺伝子の発現が有意に上昇することが明らかとなった。
- ⑧ GFP-CD40L遺伝子導入HCEMとOFP-CD40発現hPDFの共培養において、GFP-CD40L遺伝子導入HCEMとhPDSの共培養で認められるRUNX2のmRNA発現は上昇を認めなかった。

#### 【結論および考察】

本研究の結果から、歯周病のような炎症状態下においては、歯根膜細胞のCD40と歯周組織局所に浸潤した免疫細胞のCD40Lの相互作用が、炎症性サイトカインの産生を誘導し、炎症を増悪させることが示唆された。一方、正常な歯周組織においては、咬合力のようなメカニカルストレスにตอบสนองして、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が促進されることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 山 本 優 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	村上 伸也
	副 査	教授	豊澤 悟
	副 査	准教授	野崎 剛徳
	副 査	講師	村上 智彦
<b>論文審査の結果の要旨</b>			
<p>本研究は、歯周組織において CD40-CD40L の相互作用が果たす機能について検討したものである。</p> <p>その結果、炎症歯周組織においては、歯根膜細胞の CD40 と同部に浸潤した免疫細胞の CD40L の相互作用が炎症性サイトカインの産生を誘導して組織の炎症を増悪させること、また正常な歯周組織においては、メカニカルストレスに応答して誘導されるセメント芽細胞の CD40L と歯根膜細胞の CD40 が相互作用することで、歯根膜細胞の生存、増殖、及び硬組織形成細胞への分化を活性化し、歯周組織のリモデリングが促進されることを見出した。</p> <p>これらの結果は、歯周組織における CD40-CD40L 相互作用の生物学的機能の一端を明らかにし、歯周組織の恒常性維持機構及び歯周病の病態形成機構の解明につながる重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>			