The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://doi.org/10.18910/82166
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

歯周組織における
CD40-CD40L 相互作用の機能

大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学専攻

口腔分子免疫制御学講座　歯周病分子病態学

山本　優

（指導教員：村上 伸也 教授）

緒言

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、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞といった抗原提示を行う免疫細胞上に発現しており、活性化した免疫細胞上に発現するリガンドの CD40 Ligand（CD40L）と結合することにより細胞内にシグナルを誘導し、免疫グロブリンの産生、免疫細胞の活性化及び炎症反応など、免疫システムの多様な場面において重要な役割を果たす。また、CD40 は、免疫細胞以外に線維芽細胞、血管内皮細胞や上皮細胞にも広く発現していることが報告されている[1-3]。

これまでに、CD40-CD40L の相互作用は様々な組織で認められ、各組織で異なる機能を担うことが明らかとなっている。例として、気管支ではヘルパー T 細胞の分極を促進し、T 細胞の動員を抑制することでアレルギー反応を誘導することが知られている[4]。また、血管では血小板活性化因子の発現を誘導し、シクロオキシゲナーゼ 2 の活性化を介して血管内皮の増殖因子の発現を誘導し[5]、炎症や血管新生を促進することが報告されている[6]。

歯周組織は、セメント質、歯根膜、歯槽骨、歯肉から成り、歯を支える中心的な役割を担う。中でも、歯と歯槽骨の間に介在する厚さ約 0.15~0.38 mm の軟組織である歯根膜は、生理的な状態では、咬合力等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する[7]。一方、歯周炎のような炎症状態では、歯根膜に存在する線維芽細胞が細菌感染により活性化することで、炎症性サイトカインを産生し、歯周組織の破壊を誘導することが報告されている[8]。

歯周組織において、CD40 は歯根膜細胞に恒常的に発現していることが報告されており[9]、Orima らは、歯周炎病態の炎症局所において歯根膜細胞の CD40 の発現が著しく上昇することを明らかにしている[10]。これら CD40 陽性歯根膜細胞が、炎症局所に浸潤する CD40L 陽性免疫細胞と相互に作用することで、歯周炎の炎症増悪を誘導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、Alhashimi らは、ラットの切歯と第一臼歯の間にクローズドコイルを設置して第一臼歯を近心移動させた際、メカニカルストレスに応答して、歯根

膜において CD40 分子が著しく発現上昇することを確認した。すなわち、正常歯周組織において、生理的な範囲でメカニカルストレスが負荷された場合、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[11]。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に存在する細胞に誘導される CD40 が、歯周組織のリモデリング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。

そこで本研究は、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生理的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た。

材料および方法

1. 細胞培養

マウス歯根膜細胞（MPDL22）、ヒト歯根膜幹細胞（hPDS）、ヒト歯根膜線維芽細胞（hPDF）、ヒトセメント芽細胞（HCEM）を実験に供した。

マウス歯根膜細胞（MPDL22）は、生後 2.5 週齢の BALB/c マウスの臼歯部の歯周組織から outgrowth 法により単離された歯根膜細胞で、100 ng/ml の Fibroblast growth factor-2（科研製薬株式会社より恵与。以下、FGF-2 と略す）と 10 % Fetal Bovine Serum（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA、以下 FBS と略す）含有のα変法イーグル最小必須培地（和光純薬工業、大阪、日本、以下α-MEM と略す）で培養することでクローン化させたもののうち、アルカリフォスファターゼ（以下、ALP と略す）活性の高い細胞を MPDL22 として実験に供した[12]。MPDL22 は、100 ng/ml FGF-2、10 % Fetal calf serum（以下 FCS と略す） 及び 60 μg/ml カナマイシン含有α-MEMを用いて継代培養を行った。

ヒト歯根膜幹細胞（hPDS）は、歯列矯正治療中の患者から便宜抜歯された第一小臼歯から outgrowth 法を用いて増殖した細胞を、限界希釈法により単離し、10 % FCS 含有α-MEM にて培養した。得られたクローンのうち ALP 活性の高いものを hPDS として実験に供した[13]。

ヒト歯根膜線維芽細胞（hPDF）およびヒトセメント芽細胞（HCEM）は広島大学　高田 隆先生（現 名誉教授）より供与を受けた。hPDF は歯列矯正治療中の患者から便宜抜歯された小臼歯の歯根中央部の歯根膜から酵素法を用いて単離された細胞のうち、ALP 活性の低い細胞を hPDF として実験に供した。HCEM は、hPDF と同様の方法で、酵素法にて歯根膜細胞を溶解した後、セメント表面に一層残存する細胞を単離することで得た[14]。

hPDF、hPDS 及び HCEM の継代培養は 10 % FBS と 60 μg/ml カナマイシン（和光純薬工業）を加えたα-MEM を用いて行った。

2. 歯周病炎症惹起因子を用いた MPDL22 の刺激

12 穴プレート（Corning、Corning、NY、USA）に MPDL22 を 1×10^5 個/well で播種し、24 時間後、0.1 % FCS 含有 α-MEM 存在下で、0.02M リン酸緩衝生理食塩水（和光純薬工業、以下 PBS と略す）、1 ng/ml Interleukin-1β（Proteintech、Rosemont、IL、USA、以下 IL-1 βと略す）、10 μg/ml *Porphyromonas gingivalis* 菌（以下、*P.g.*菌と略す）由来 Lipopolysaccharide（SIGMA-Aldrich、St. Louis、MO、USA、以下 LPS と略す）にて 24 時間刺激した。

3. 全 RNA の抽出および相補的 DNA の精製

培養細胞からの全 RNA 抽出には RNA-bee（TEL-TEST、Friendswood、TX、USA）を用いた。すなわち、細胞を PBS で洗浄した後、600 μl の RNA-bee を加えて可溶化し、1/3 量のクロロホルム（和光純薬工業）を添加後、12,000 rpm、4 ℃にて 15 分間の遠心分離を行った。分離された水層を抽出し、同量のイソプロパノール（和光純薬工業）を添加し、再び 12,000 rpm、4 ℃にて 5 分間遠心した。100 %エタノール 1 ml を添加し 7,500 rpm、4 ℃にて 5 分間遠心した後、得られた沈殿物をジエチルピロカルボン酸処理水（ニッポンジーン、富山、日本、以下 DEPC と略す）にて全 RNA を溶解した。精製した全 RNA を鋳型とし、High Capacity RNA-to DNA kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて逆転写反応を行い、相補的 DNA（以下 cDNA と略す）を作製した。

4. Real-Time PCR 法による遺伝子発現解析

Real-Time PCR 法による解析は、cDNA を鋳型として表 1 に示す各遺伝子特異的なプライマー（タカラバイオまたは Gene Design、大阪、日本）を用いて行った。PCR 反応は Fast SYBR® Green PCR Master Mix（Applied Biosystems、City of Foster City、CA、USA）を用いて StepOnePlus Real-time PCR System（Applied Biosystems）にて行った。

各遺伝子の発現量は、マウス由来の遺伝子解析には、ハウスキーピング遺伝子の一つである *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*（以下、*Gapdh* と略す）を、ヒト由来の遺伝子解析には、同じくハウスキーピング遺伝子の一つであ

る *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*（*HPRT*）を内在性コントロール遺伝子として用い、同遺伝子の発現量に対する相対量として算出した。

本実験で用いたプライマーの配列を以下に示す。

表 1.　本研究で使用した Real-Time PCR 用プライマーの一覧
（F：Forward　R：Reverse）

遺伝子名		プライマーの配列
ヒト *Runt-related transcription factor 2*（*RUNX2*）	F	5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'
	R	5'-CATTCCGGAGCTCAGCAGAATAA-3'
ヒト *Alkaline Phosphatase*（*ALP*）	F	5'-GGACCATTCCCACGTCTTCAC-3'
	R	5'-CCTTGTAGCCAGGCCCATTG-3'
ヒト *Osteocalcin*（*OCN*）	F	5'-CCCAGGCGCTACCTGTATCAA-3'
	R	5'-GGTCAGCCAACTCGTCACAGTC-3'
ヒト *Type 1 Collagen*（*COL1A1*）	F	5'-CCCGGGTTTCAGAGACAACTTC-3'
	R	5'-TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC-3'
ヒト *Decorin*（*DCN*）	F	5'-TTGGACAACAACAAGCTTACCAGAG-3'
	R	5'-AGTACTGGACCGGGTTGCTGA-3'
ヒト *Periodontal ligament associated protein-1*（*PLAP-1*）	F	5'-ATGGGAGTCTTGCTAACATACCAC-3'
	R	5'-CAGAAGTCATTTACTCCCACTCTTG-3'
ヒト *Biglycan*（*BGN*）	F	5'-GGGAGCTCCACTTGGACAACA-3'
	R	5'-GTTGACACCCACTTTGGTGATG-3'
ヒト Periostin（*POSTN*）	F	5'-CATTGATGGAGTGCCTGTGGA-3'
	R	5'-CAATGAATTTGGTGACCTTGGTG-3'
ヒト *CD40*	F	5'-CTGAGAGCCCTGGTGGTGAT-3'
	R	5'-AGCAGTGTTGGAGCCAGGAA-3'
ヒト *CD40L*	F	5'-AAAGCCAGTTTGAAGGCTTTGTG-3'
	R	5'-GTTACCAAGTTGTTGCTCATGGTG-3'
ヒト *HPRT*	F	5'-GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA-3'
	R	5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC-3'
マウス *Cd40*	F	5'-TGTGATTTGGCTCTTCTGATCTCG-3'
	R	5'-CACGTAACACACTGCCCTAGATGG-3'

マウス *Gapdh*	F	5'-CCGGTGCTGAGTATGTCGTG-3'
	R	5'-CCGGTGCTGAGTATGTCGTG-3'

5. フローサイトメトリー

細胞を PBS にて洗浄後、セルスクレイパー（IWAKI Science Products、静岡、日本）を用いてプレートから回収し、12,000 rpm、4 ℃、5 分間遠心後、1 % BSA 含有 Hanks' 平衡塩溶液（Thermo Fisher Scientific、以下 FACS Buffer と略す）にて洗浄した。その後、細胞に 1 次抗体を 1：100 の濃度で添加し、4 ℃にて 30 分間反応させた。細胞を FACS Buffer で洗浄後、フローサイトメーター（FACS Calibur、日本ベクトンディッキンソン、東京、日本）を用いて解析した。得られたデータをフローサイトメトリー専用解析ソフトウェア FlowJo®（日本ベクトンディッキンソン）を用いて解析した。フローサイトメトリー解析には、PE 標識 抗マウス CD40 抗体（BD Biosciences、San Jose、CA、USA）、PE 標識 抗ラット IgG2a 抗体（BioLegend、San Diego、CA、USA）、PE 標識 抗ヒト CD40 抗体、PE 標識 抗ヒト CD40L 抗体（BioLegend）、PE 標識 抗ラット IgG 抗体（BioLegend）、および抗ラット抗 GFP 抗体（BioLegend）を用いた。

6. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（以下、ELISA と略す）測定

12 穴プレート（Corning）に MPDL22 を 1×10^{5} 個/ well で播種し、 FCS 無添加のα–MEMにて 24 時間培養した後、1 μg/ml の soluble CD40L （R&D Systems、Minneapolis、MN、USA、以下 sCD40L と略す）で刺激した。8 時間後及び 72 時間後に、上清中の Tumor Necrosis Factor （以下 TNF-α と略す）または Interleukin-6（以下、IL-6 と略す）の産生量を mouse TNF-α Quantikine ELISA kit（R&D Systems）及び mouse IL-6 Quantikine ELISA kit（R&D Systems）を用いて測定した。

7. マウス創傷治癒モデル

マウス創傷治癒モデルは奥村らの方法を一部改良して行った [15]。8～12 週齢のオスの BALB/c マウス（日本 SLC 社、静岡、日本）を用いて創傷治癒モデルを作製した。すなわち、マウスに三種混合麻酔薬【塩酸メデトミジン（和研薬株

式会社、京都、日本）、ミダゾラム（アストラゼネカ株式会社、大阪、日本）、ブトルファノール（Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本）】を腹腔内投与し深麻酔を施した。その後、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た。そして、5 ml の sCD40L を創傷面に均一に塗布し、創傷部を Bioclusive 創傷被覆材（Johnson and Johnson、New Brunswick、NJ、USA）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、WinRoof ソフトウェア（三谷産業株式会社、福井、日本）を用いて傷の面積を算出した。創傷面積の割合は、0 日目の傷の面積を基準として算出した。全ての動物実験は、大阪大学動物管理・使用委員会の承認を得て行われた（#27-019）。

8. 凍結切片の作成

マウスから創傷部の皮膚組織を採取し、採取した組織を包埋容器中に注入した包埋コンパウンドに浸漬し、ドライアイスにて冷却したヘキサンを用いて急速凍結させることにより包埋した。凍結後、凍結ブロックを取り出し、クライオスタット（CM3050S、Leica Microsystems、Wetzlar、Germany）にて厚さ 8 μm で矢状断に薄切して凍結切片を作製した。

9. ヘマトキシリン／エオジン（以下、HE と略す）染色

組織学的解析は、HE 染色にて行った。HE 染色は、株式会社モルフォテクノロジー（札幌市、日本）に委託した。すなわち、パラフィン切片をヘマトキシリンで 5 分染色した後、流水にて水洗し、エオジンに 1 分反応させてから、90 %または 100 %エタノールで 1 分ずつ脱水後、キシレンにて透徹させた。染色画像は、Nano Zoomer S360 バーチャルスライドスキャナー（浜松ホトニクス、静岡、日本）を用いて撮影した。

10. 免疫蛍光染色法

創傷治癒モデルマウスの皮膚創傷部の凍結切片を用いて、免疫蛍光染色を行った。すなわち、作成した皮膚組織の凍結切片を、100 %エタノールに浸漬し、PBS にて洗浄後、4 %PFA にて固定をした。その後、1 次抗体（好中球マーカーとして 1 μg/ml の FITC 標識 抗ラット Ly6G 抗体 、マクロファージマ

ーカーとして 1 μg/ml 抗ラット F4/80 抗体）を用いて、室温にて 2～3 時間反応させた。その後、２次抗体（抗ラット Alexa Fluor 555 IgG 抗体）で 1 時間反応させた。最後に、4',6-diamidino-2-phenylindole（SIGMA-Aldrich、以下 DAPI と略す）を用いて核染色後、ECLIPS Ti fluorescence 顕微鏡（ニコン、東京、日本）にて染色画像を取得した。得られた画像の 1.2 mm^2 内における各免疫細胞の占める割合を、NIH Image J ソフトウェア（National Institutes of Health、Bethesda、MD、USA）を用いて計測した。

11. 矯正力負荷によるマウスの第一臼歯近心移動モデル

12 週齢オスの C57BL6/J マウス（日本クレア株式会社、東京、日本）を用いて、マウス第一臼歯の近心移動を Hakami らの方法に準じて行った[16]。すなわち、マウスにペントバルビタールナトリウム 1 ml を腹腔内投与し、深麻酔を施した。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（トミー株式会社、福島、日本）を設置し、直径 0.01 mm のスチールワイヤー（トミー株式会社）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、近心方向に移動させた。

12. パラフィン切片の作成

マウスを安楽死させた後、PBS および 4 %パラホルムアルデヒド（和光純薬工業、以下 PFA と略す）を用いて灌流固定を行った後、上顎骨を採取した。採取した上顎骨は、14 %エチレンジアミン四酢酸（和光純薬工業、以下 EDTA と略す）を用いて 21 日間脱灰後、パラフィンワックス（和光純薬工業）に埋没し、パラフィンブロックを作製した。そして、Leica Biosystems RM2245（Leica Biosystems）を用いて、上顎第一臼歯の歯根尖 1/3 付近で水平断に厚さ 4 μm で薄切してパラフィン切片を作成した。

13. 免疫化学染色法

歯周組織における CD40L 発現の免疫化学染色は、株式会社モルフォテクノロジーに委託した。すなわち、作製したパラフィン切片をヒストクリア®（コスモ・バイオ株式会社、東京、日本）を用いて脱パラフィン処理し、10 倍に希釈した Dako Target Retrieval Solution（Agilent、Santa Clara、CA、USA）

に浸漬し、DECLOAKING CHAMBER NxGen（BIOCARE MEDICAL、Pacheco、CA、USA）を用いて 80 ℃で 3 分間抗原の賦活化処理を施した。30 分の徐冷後、BSA 含有 PBS にて 1 時間室温でブロッキング処理を施した。その後、切片を抗ウサギ CD40L 抗体（1:400）あるいは抗ウサギ IgG Isotype Control 抗体（1:400、Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA）を用いて、4 ℃、オーバーナイトで処理した。その後、2 次抗体（Rabbit-on-Rodent Horseradish peroxidase-Polymer（BIOCARE MEDICAL））を用いて室温で 30 分間反応させた後、3,3′-Diaminobenzidine（和光純薬工業、以下 DAB と略す）にて発色させた。ヘマトキシリン（武藤化学株式会社、東京、日本）にて対比染色を行い、OLYMPUS BX51（OLYMPUS、東京、日本）にて観察した。

14. Green Fluorescent Protein（以下、GFP と略す）観察による遺伝子導入の確認

5×10^4個の GFP-CD40L 遺伝子導入 HCEM をガラスボトムディッシュ（松浪硝子工業株式会社、大阪、日本）に播種したのち、2 μg/ml の DAPI（SIGMA-Aldrich）を用いて核を染色し、共焦点顕微鏡（SP8 Lightning 共焦点顕微鏡、Leica Microsystems）にて GFP の発現を観察した。対照群には、遺伝子導入をしていない HCEM を用いた。

15. *in vitro* 培養細胞伸展法

培養細胞伸展システム Shellpa® NNMS002（メニコンライフサイエンス、愛知、日本）を用いて、*in vitro* で HCEM にメカニカルストレスを付与した。すなわち、シリコンチャンバー（メニコンライフサイエンス）を希塩酸（pH3.0, 10^{-3}M、和光純薬工業）を用いて 10 倍希釈した Collagen Type I（新田ゼラチン株式会社、大阪、日本）を用いてコーティングした。その後、コラーゲンコーティングしたシリコンチャンバーに 1.5×10^5個/ チャンバーの HCEM を播種し、37 ℃ 5 % CO_2存在下で 24 時間静置した。その後、Shellpa®のチャンバーホルダーにシリコンチャンバーを設置し、伸展率 10 %、0.5 Hz の強さで 37 ℃、5 % CO_2存在下で 24～72 時間、細胞に伸展刺激を付与した。

16. 遺伝子導入

遺伝子導入システム Neon®（Thermo Fisher Scientific）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。すなわち、12 穴プレート（Corning）に 3×10^5 個/well の HCEM を播種した。その後、GFP 発現ベクターもしくは GFP-CD40L 発現ベクター（Sino Biological、北京、中国）を、1,100 Voltage、20 Width、1 pulse の条件下にて細胞に導入した。また、hPDF への Orange Fluorescent Protein（以下、OFP と略す）-CD40 発現ベクター（Sino Biological）の遺伝子導入も同様の方法を用いて行った。

17. アルカリフォスファターゼ活性測定

hPDF および HCEM 細胞の硬組織形成細胞への分化過程における ALP 活性は、Bessay らの方法に準じて行った[17]。すなわち、hPDF および HCEM を 6 穴プレート（Corning）に 1 well につき 3×10^5 個播種し、石灰化誘導培地にて培養した。培養上清を除去後、細胞を PBS にて洗浄し、0.01 M【トリス（SIGMA-Aldrich）- 塩酸（和光純薬工業）】（以後、Tris-HCl と略す）を添加後、Handy Sonic model UR-20P（株式会社トミー精巧、東京、日本）を用いて超音波で 15 秒間細胞を粉砕した。その後、細胞破砕液を回収して遠心機（TOMY MX-307、株式会社トミー精巧）にて 12,000 rpm、4 ℃、5 分間遠心し、上清を回収し、1 ml あたりに 1 M Tris-HCl を 500 μl、5 mM 塩化マグネシウム（和光純薬工業）100 ml を添加した後、50 mM パラ-ニトロフェニル-2-リン酸ナトリウム（和光純薬工業、以下 pNPP と略す）を 100 ml 添加したのちに 20 分間室温にて反応させた。1N 水酸化ナトリウム水溶液（和光純薬工業）を 250 ml 加えることで反応を止め、マイクロプレートリーダー（BioRad Laboratories、Hercules、CA、USA）にて波長 405 nm における吸光度を測定した。標準曲線の作成にはウシ腸管粘膜由来 ALP（SIGMA-Aldrich）を用い、室温にて毎分 1 mmol の pNPP を加水分解する ALP 活性を 1 unit とし、総 DNA 量 1 mg 当たりのユニット値で示した。

18. アリザリンレッド染色

細胞の石灰化物形成能は、Dahl らの方法に準じてアリザリン染色法により評価した[18]。6 穴プレート（Corning）に HCEM を 3×10^5 個/ well で播種したのち、石灰化誘導培地にて長期培養を行った。培養 14 日目、23 日目、28 日目に培養上清を除去後、PBS にて洗浄し、100 %冷エタノールにて 5 分間固定した。蒸留水で洗浄後、1 % アリザリンレッド染色液（和光純薬工業）で 5 分間染色した。アリザリン濃染部の石灰化物を、スキャナー（EPSON、長野、日本）で取り込み、画像解析ソフトウェア WinRoof（三谷産業株式会社）を用いて解析した。

19. 歯根膜細胞とセメント芽細胞の共培養

GFP または GFP-CD40L 遺伝子導入 HCEM を、5 %CO_2 存在下、37 ℃で 24 時間培養した。その後、細胞毒性の検討については、歯根膜細胞：セメント芽細胞の比が 10：1、2：1、1：1 の割合になるように、12 穴プレート（Corning）に 5×10^4 個の歯根膜細胞と、 5×10^3 個、2.5×10^4 個、5×10^4 個のセメント芽細胞を播種し、48 時間共培養した。細胞増殖能については、96 穴プレート（Corning）に、歯根膜細胞：セメント芽細胞の比が 2：1 になるように、1×10^4 個/ well の歯根膜細胞と、0.5×10^4 個/ well のセメント芽細胞を播種し、48 時間共培養を行った。また、硬組織形成細胞への分化能および細胞外マトリックス産生能の検討については、歯根膜細胞：セメント芽細胞の比が 10：1、5：1、2：1、1：1 の割合になるように、12 穴プレート（Corning）に 5×10^4 個の歯根膜細胞と、 5×10^3 個、1×10^4 個、2.5×10^4 個、5×10^4 個のセメント芽細胞を播種し、72 時間共培養した。

20. 細胞毒性評価

ヨウ化プロピジウム（和光純薬工業、以下 PI と略す）陽性細胞の割合をフローサイトメトリー解析することで細胞毒性を検討した。すなわち、細胞をセルスクレイパーにて回収し、PI 染色し、フローサイトメーター（FACS Calibur）にて PI 陽性の死細胞の割合を測定した。得られたデータは、FlowJo（日本ベクトンディッキンソン）を用いて解析した。

21. 細胞増殖能

Bromodeoxyuridine（以下、 BrdU と略す）アッセイキット（SIGMA-Aldrich）を用いて、増殖細胞の割合をルミノメーターにて解析した。すなわち、歯根膜細胞とセメント芽細胞の共培養 48 時間後に 10 μl/ well の BrdU solution を添加し、5 % CO_2 存在下、37 ℃ にて 2 時間培養後、細胞を 200 μl/ well の Fix Denat を用いて固定した。その後、Peroxidase（以下、POD と略す）標識 抗 BrdU 抗体を添加し、90 分間室温で反応させた。その後、基質を添加し、3 分間遮光にて振盪させた後、GLOMAX®（Promega、Madison、WI、USA）にて発光強度を計測した。

22. 統計学的解析

in vitro 細胞培養実験のデータは平均値 ± 標準偏差で示し、*in vivo* 実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較はスチューデントの t 検定を、多群比較は分散分析（ANOVA）用いて行い、$p<0.05$ を有意差ありとした。

結果

1. 歯根膜細胞における CD40 発現レベルの検討

まず、フローサイトメーターを用いて MPDL22 における CD40 の発現を検討した。フローサイトメトリー解析の結果、MPDL22 は CD40 タンパクを発現していることが明らかとなった（図 1）。このことから、歯根膜細胞は CD40 を発現していることが確認できた。

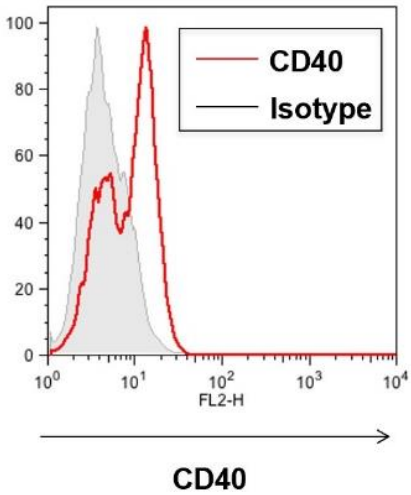


図 1　歯根膜細胞における CD40 発現レベルの検討

MPDL22 における CD40 タンパクの発現を、フローサイトメーターを用いて検討した結果を示す。

赤線部：CD40　灰色部：isotype control

解析結果は、3 回実験を行い、得られた同様の結果のうち代表例を示す。

2. 歯周病炎症惹起因子に対する歯根膜細胞の *CD40* mRNA 発現変化

歯周炎病態下において、歯周組織に存在する細胞は、炎症性サイトカインや歯周病原菌由来の内毒素（LPS）に暴露されている[8]。そこで、これら歯周病炎症惹起因子による刺激が歯根膜細胞上の CD40 の発現に与える影響について検討を行った。MPDL22 を IL-1β（1 ng/ml）、*P.g.*菌由来 LPS（10 μg/ml）で刺激し、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。等量の PBS で刺激した細胞群を対照群として用いた。Real-Time PCR 解析の結果、対照群の PBS 刺激群と比較して、IL-1β 刺激群および *P.g.*菌由来 LPS 刺激群において、*CD40* mRNA 発現が有意に上昇することが明らかとなった（図 2）。

以上の結果から、歯周組織において、IL-1βや LPS などの歯周病炎症惹起因子の刺激に応答して、歯根膜細胞の *CD40* mRNA 発現が誘導されることが明らかとなった。

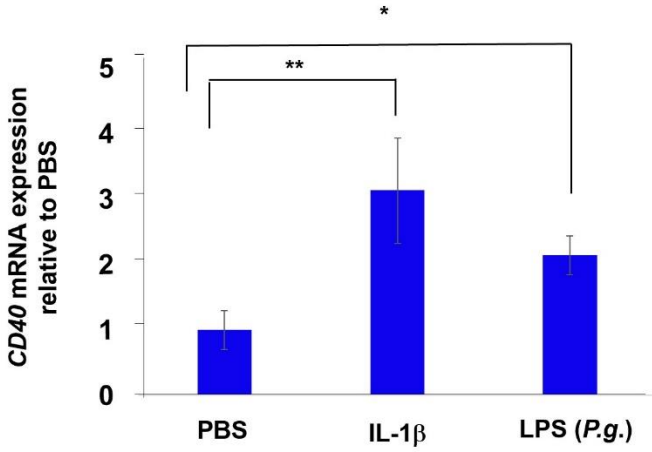


図 2　歯周病炎症惹起因子に対する歯根膜細胞の *CD40* mRNA 発現応答

IL-1β（1 ng/ml）または LPS（10 μg/ml）を用いて MPDL22 を 24 時間刺激した際の *CD40* mRNA の発現変化を Real-Time PCR 法にて検討した結果を示す。n= 3±標準偏差　＊p <0.05　＊＊p <0.01

3. CD40L 刺激によるマウス歯根膜細胞からの TNF-α および IL-6 の産生

歯周病病態下では、歯周組織に活性化した免疫細胞が浸潤しており、これら活性化した免疫細胞は CD40L を発現することが報告されている[10]。すなわち、これら CD40L 発現細胞と歯根膜細胞上に発現する CD40 が相互に作用することで、歯周病の炎症反応を誘導している可能性が示唆される。そこで次に、歯根膜細胞が CD40L 分子に暴露した際に炎症性サイトカインの産生が促進するのか否かを ELISA 解析により検討した。MPDL22 を sCD40L（1 μg/ml）で刺激し、培養上清中に含まれる、骨吸収に関連する炎症性サイトカインである TNF-α および IL-6 の量を ELISA 解析にて測定した。ELISA 解析の結果、sCD40L 刺激により MPDL22 細胞からの TNF-αおよび IL-6 の産生が有意に促進することが明らかとなった（図 3）。

このことから、歯周組織における CD40-CD40L 相互作用は歯周組織の炎症を誘導することが示唆された。

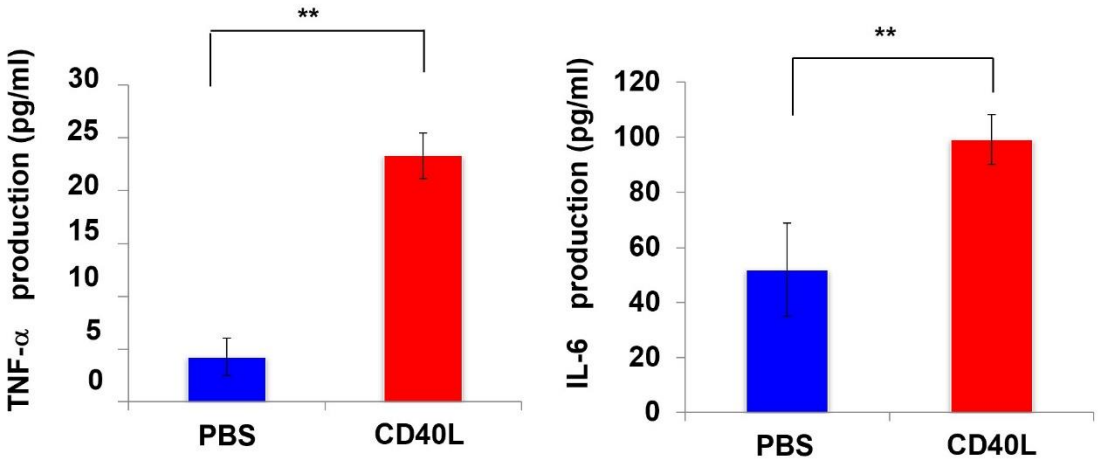


図 3　CD40L 刺激によるマウス歯根膜細胞からの TNF-αおよび IL-6 の産生

MPDL22 を sCD40L（1 μg/ml）で 8 時間から 72 時間刺激し、細胞上清中に含まれる TNF-α（左）と IL-6（右）の産生量を ELISA にて解析した結果を示す。n= 3±標準偏差　＊＊p<0.01

4. マウス創傷治癒モデルを用いた CD40L 刺激による炎症誘導の評価

in vitro 解析の結果より、歯根膜細胞の CD40 が CD40L と作用すると、歯周組織において炎症を誘導することが明らかとなった。そこで、次に *in vivo* において、CD40-CD40L 相互作用が組織の炎症を誘導するのか否かについて検討を行った。歯周組織において CD40L 刺激で誘導される炎症を定量化するのに適した動物モデルがないため、本研究では、歯根膜細胞と同様の線維芽細胞である、皮膚の線維芽細胞における炎症を評価するマウス創傷治癒モデルを用いることとした[15]。マウスの背部に直径 1.6cm の大きさで傷を作成し、同部に sCD40L（5 μg）を投与した。術後 7 日目に、創傷部の面積の測定、HE 染色、免疫染色を行い、CD40L で誘導される組織の炎症を評価した。また、対照群には等量の PBS を創傷部に投与したマウスを用いた（図 4-A）。*in vivo* 実験の結果、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く、治癒遅延を認めることが明らかとなった（図 4-B）。

以上の結果から、CD40-CD40L 相互作用は、損傷組織の炎症を持続させ、その治癒を遅延させることが示唆された。

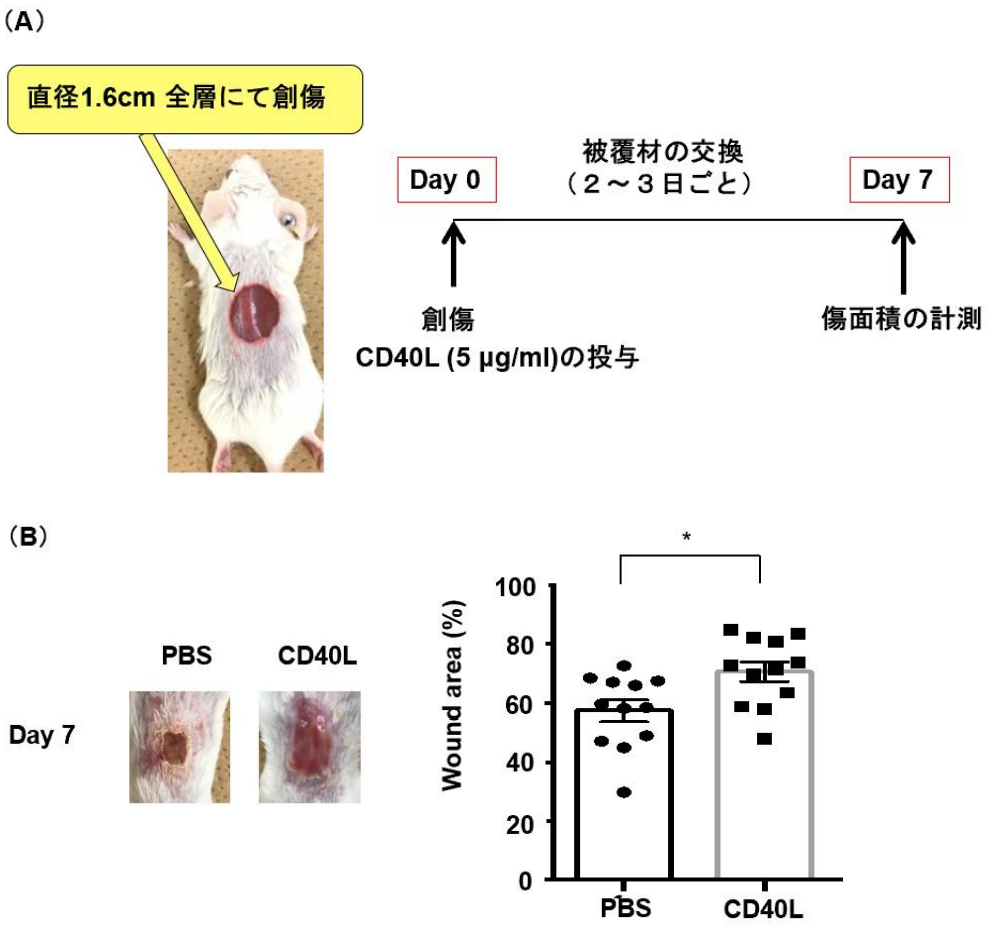


図４　マウス創傷治癒モデルを用いた CD40L 刺激炎症誘導の評価

（A）　マウスの創傷治癒モデルを用いた CD40L 刺激炎症誘導の評価方法の概要。

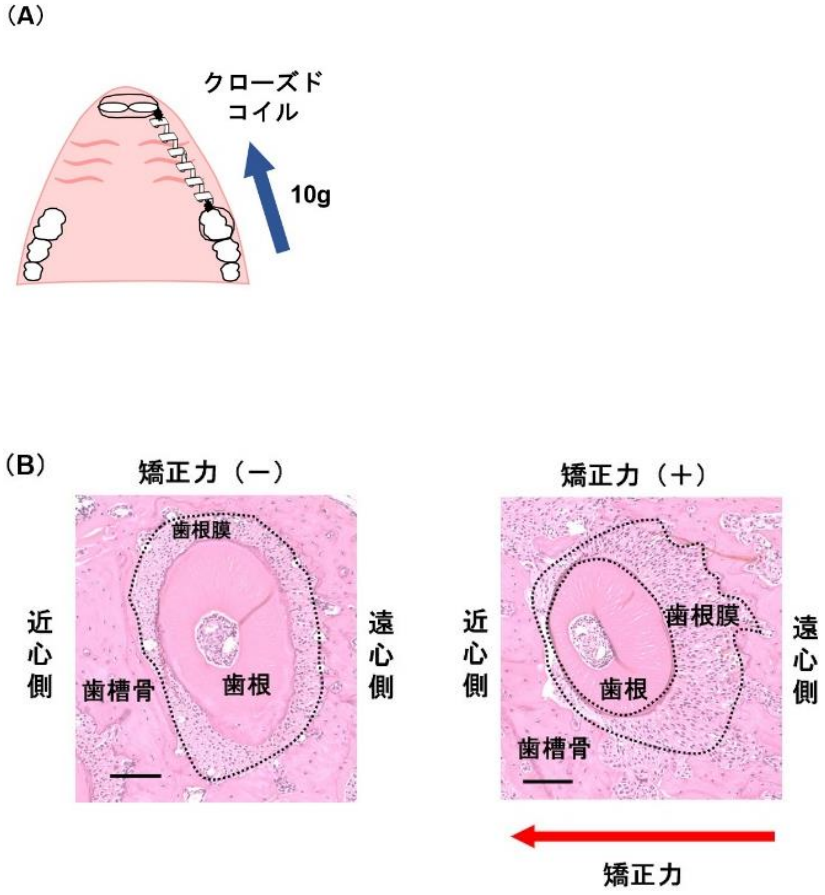
（B）　創傷部に CD40L（5 μg/ml）あるいは PBS（5 μg/ml）投与後、7 日目の傷の状態（左）と、同じく Day 7 の傷の面積を Day 0 の傷の面積に対する割合で示したグラフ（右）を示す。傷の写真は得られた同様の結果のうち代表例を示す。CD40L 投与群：n=12±標準誤差、PBS 投与群：n=12±標準誤差、＊p<0.05

5. メカニカルストレス存在下の歯周組織における CD40L の局在

炎症状態下において、CD40-CD40L の相互作用は歯周組織の炎症反応を増悪することが示唆されたが、一方、生理的な状態下の歯周組織は、咬合力に常に晒されており、このようなメカニカルストレスにより、歯根膜細胞上に CD40 の発現が誘導されることが報告されている[11]。そこで次に、メカニカルストレス誘導性の CD40-CD40L 相互作用が歯周組織に誘導された際、同組織にどのような影響を及ぼすのかについて検討した。Alhashimi らは、歯周組織に矯正力を加えると、歯根膜細胞の CD40 発現が上昇することを報告している。そこで、まず、*in vivo* において、歯周組織にメカニカルストレスが負荷された際に、そのリガンドである CD40L が誘導されるのか、また、その局在について検討することを目的として、マウスの第一臼歯近心移動モデルを用いて解析を進めた。12 週齢オスの C57BL6/J マウスの上顎左側第一臼歯に、ニッケルチタン製のクローズドコイルスプリングを用いて 10 g の力を 12 日間付与し、上顎左側第一臼歯の近心移動を行った（図 5-A）。近心移動開始 12 日目の、メカニカルストレス付与群の上顎左側第一臼歯の頬側根水平断の HE 染色像より、歯根膜内で歯根が矯正力の方向である近心側に移動していることが確認できた（図 5-B）。このことから、上顎左側第一臼歯に正常にメカニカルストレスが負荷されていることを確認した。

次に、実験開始から 12 日目の第一臼歯歯根とその歯周組織における免疫染色の結果、矯正力のかかる方向である近心側（圧迫側）では、歯根表面に存在する多核巨細胞において CD40L の発現を認めた（図 5-C 青矢頭）。一方、矯正力方向と反対側である遠心側（牽引側）では、セメント質表面に存在する細胞において、抗 CD40L 抗体の濃染を認めた（図 5-C、上段赤枠内の赤矢頭）。また、歯槽骨表面上に存在する骨芽細胞においても CD40L の発現を認めた（図 5-C 緑矢頭）。非メカニカルストレス付与の対照群においても、セメント質表面に存在する細胞に CD40L 陽性の細胞を認めたが、メカニカルストレス付与群と比較すると、CD40L の発現は低かった（図 5-C、中央段）。Isotype control を用いた免疫染色像では、これらの細胞において、DAB 陽性部を認めなかった（図 5-C、下段）。

以上の結果から、メカニカルストレス付与により、圧迫側では多核巨細胞上に、牽引側ではセメント質表面に存在する細胞上に CD40L が発現することが示唆された。



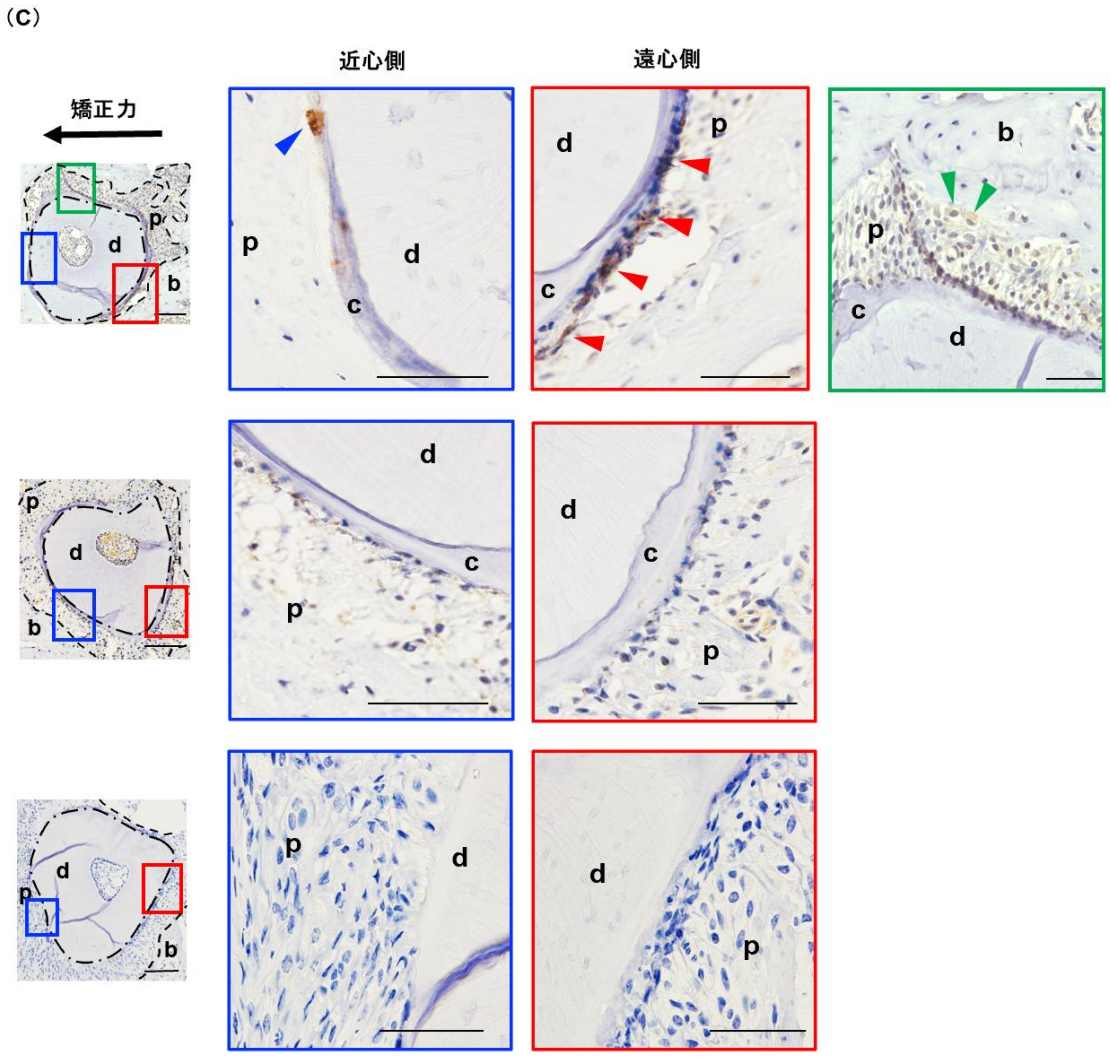


図 5　メカニカルストレス存在下の歯周組織における CD40L の局在

(A)　矯正力負荷によるマウス第一臼歯近心移動モデルの概要を図示する。上顎左側第一臼歯と前歯の間にクローズドコイルを設置し、10 g の力で 12 日間上顎左側第一臼歯を近心移動させた。上顎右側第一臼歯を対照群として用いた。

(B)　メカニカルストレス付与 12 日後のマウス上顎右側第一臼歯（左）と左側第一臼歯（右）の頬側遠心根水平断の HE 染色像を示す。矢印（赤）：メカニカルストレスの方向　スケールバー：100 μm
解析結果は、5 回実験を行い、得られた同様の結果のうち代表例を示す。

(C)　上顎第一臼歯の口蓋根と歯周組織の水平断の CD40L 免疫染色の結果を示す。
上段：メカニカルストレス（＋）　抗 CD40L 抗体処理、中段：メカニカルストレス（—）　抗 CD40L 抗体処理、下段：メカニカルストレス（＋）　isotype control
左：弱拡大像（×100）、青枠：近心側の強拡大像（×400）、右：遠心側の強拡大像（×400）、矢印：メカニカルストレスの方向
d：象牙質　b：歯槽骨　p：歯根膜　c：セメント質　青矢頭：CD40L 陽性多核巨細胞　赤矢頭：セメント質表面上の CD40L 陽性細胞　緑矢頭：骨芽細胞
スケールバー：100 μm（弱拡大）、50 μm（強拡大）
解析結果は、5 回実験を行い、得られた同様の結果のうち代表例を示す。

6. *in vitro* 培養細胞伸展法を用いたセメント芽細胞へのメカニカルストレスの付与

in vivo において、歯周組織にメカニカルストレスが付与されると、同組織に CD40L の発現が誘導されたことから、CD40-CD40L 相互作用はメカニカルストレスに応答して、歯周組織に何らかの影響を及ぼすことが強く示唆される。また、歯根膜細胞における CD40 の発現もメカニカルストレスで上昇することから、歯根膜細胞の CD40 と CD40L 分子が相互作用することが推察される。図 5 の結果より、圧迫側では、歯根膜が圧迫され、その細胞成分がほとんど確認できないことに対し、牽引側では伸展された歯根膜に豊富に歯根膜細胞が存在すること、及び、*in vivo* において、メカニカルストレスにより歯根根尖 1/3 付近に存在する歯根表面上の細胞に CD40L の発現が上昇することから、我々は次に、これらの細胞とセメント質表面に存在する細胞との間で、CD40-CD40L の相互作用が誘導される可能性があるとの仮説を立て、この点について検討することにした。歯根の根尖 1/3 付近においては、歯根表面やセメント質表面にセメント芽細胞の配列を認める[19]ことから、メカニカルストレス存在下で CD40L を発現している細胞はセメント芽細胞であることが示唆される。

そこでまず、セメント芽細胞がメカニカルストレスに応答して CD40L 分子を発現するか否かについて、*in vitro* にて細胞にメカニカルストレスを付与することで検討を行うことにした。

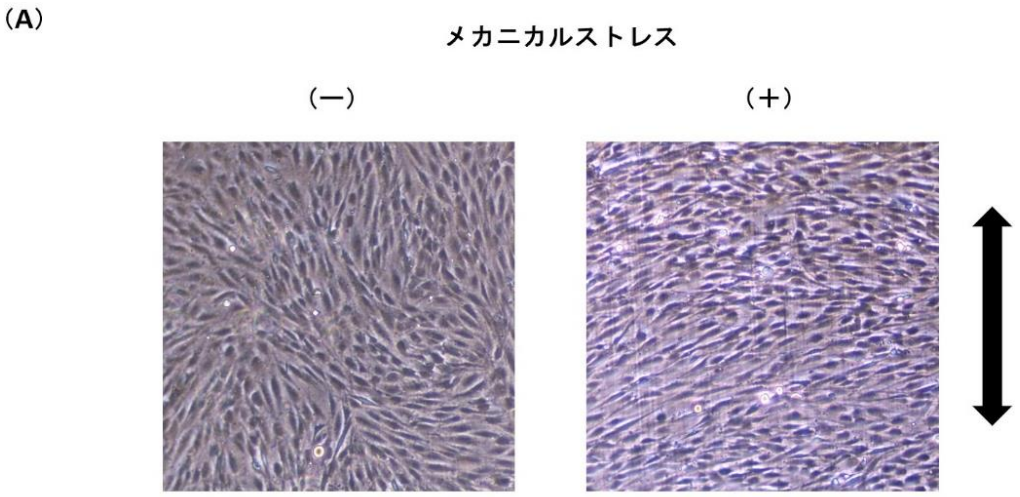
培養細胞伸展システム Shellpa® を用いて、ヒトセメント芽細胞（HCEM）に 0.5 Hz、10 %の力でメカニカルストレスを付与した。メカニカルストレス付与 24 時間後の細胞形態を観察した結果、メカニカルストレスを付与していない対照群とメカニカルストレス付与群では、HCEM がメカニカルストレスの方向に対して垂直に走行する様子が観察された（図 6-A）。このことから、今回設定した力で HCEM に対してメカニカルストレスが付与できていることが確認できた。

そこで次に、HCEM にメカニカルストレスを付与した際に、CD40L の発現が誘導されるのか否かを検討するため、先程と同じ条件で、HCEM にメカニカルストレスを付与し、経時的な CD40L のタンパク発現レベルをフローサイトメーターにて検討した。フローサイトメトリー解析の結果、メカニカルストレス付与後、24 時間では対照群とメカニカルストレス付与群において CD40L

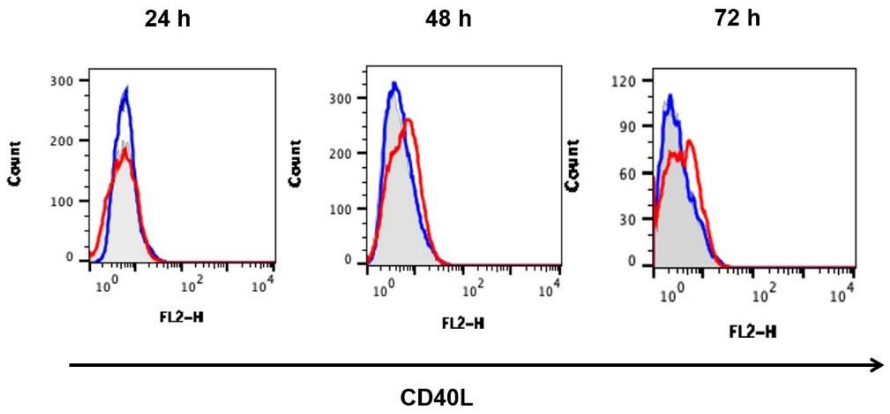
の発現に顕著な差を認めなかったが、48 時間以後においては対照群と比較して、メカニカルストレス付与群において CD40L タンパク発現が上昇することが明らかとなった（図 6-B)。このことから、セメント質表面に存在し、メカニカルストレスに応答して CD40L を発現した細胞はセメント芽細胞であることが示唆された。

一方、同じ条件で、歯根膜細胞（後述の hPDF）にメカニカルストレスを付与した際の CD40 および CD40L のタンパク発現レベルをフローサイトメーターにて解析した。フローサイトメトリー解析の結果、対照群と比較して、メカニカルストレス付与群において、CD40 タンパクの発現レベルの上昇を認めた（図 6-C 左)。一方、CD40L については対照群と比較して CD40L のタンパク発現に変化を認めなかった（図 6-C 右)。

これらの結果から、歯周組織にメカニカルストレスが付与されることにより、セメント芽細胞上に発現誘導される CD40L 分子が、メカニカルストレス応答性の歯根膜細胞の CD40 分子と相互作用することが示唆された。



（B）



（C）

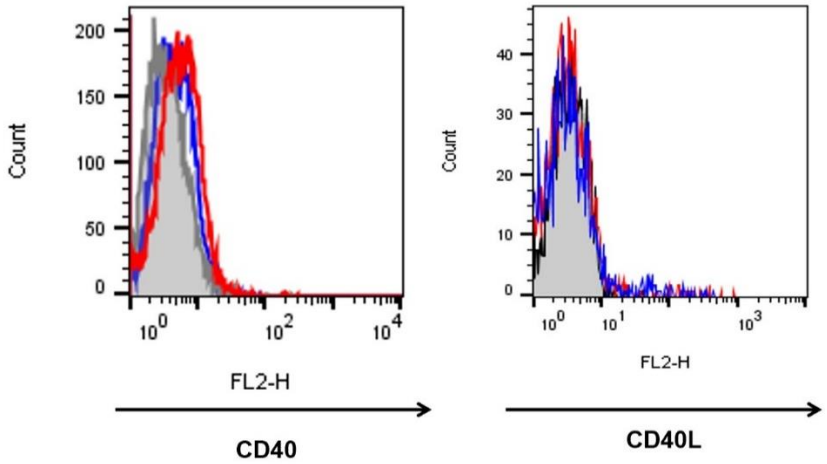


図６　*in vitro* 培養細胞伸展法を用いたセメント芽細胞へのメカニカルストレスの付与

HCEM に、伸展力 10 %、0.5 Hz の力で *in vitro* で伸展刺激を加えた。

（A）メカニカルストレス付与後 48 時間の HCEM の細胞形態を示す。
矢印：伸展方向　左：メカニカルストレス非付与、右：メカニカルストレス付与
３回実験を行い、得られた同様の結果のうち代表例を示す。

（B）メカニカルストレス付与後の HCEM における経時的な CD40L タンパク発現レベルをフローサイトメーターにて検討した結果を示す。
メカニカルストレス付与後 24 時間（左）、48 時間（中央）、72 時間（右）
青：メカニカルストレス（－）、赤：メカニカルストレス（＋）、灰：isotype control
3 回実験を行い、得られた同様の結果のうち代表例を示す。

（C）歯根膜細胞に 72 時間メカニカルストレスを負荷した際の、CD40（左）および CD40L（右）のタンパク発現レベルをフローサイトメーターを用いて検討した結果を示す。青：メカニカルストレス（－）、赤：メカニカルストレス（＋）、灰：isotype control。３回実験を行い、得られた同様の結果のうち代表例を示す。

7. GFP-CD40L 発現遺伝子導入 HCEM の作製

in vitro のシステムで長期的にメカニカルストレスを付与すると細胞への負荷がかかり、細胞がプレートからはがれてしまい、以後の機能解析が困難なため、HCEM に CD40L を遺伝子導入することにより、メカニカルストレスを負荷した状態を模して CD40-CD40L 相互作用の機能解析を行うことにした。

遺伝子導入システム Neon®を用いて、GFP-CD40L 発現ベクターを HCEM に遺伝子導入し、遺伝子導入の効率を蛍光免疫染色法およびフローサイトメーターを用いて検討した。蛍光免疫染色の結果、対照群である GFP-CD40L 非導入群の HCEM と比較して、GFP-CD40L 遺伝子導入 HCEM において、GFP の顕著な発現を認めた（図 7-A）。また、フローサイトメーターにて CD40L および GFP のタンパク発現レベルを検討した。フローサイトメトリー解析の結果、CD40L のタンパク発現は、対照群と比較して、GFP-CD40L 発現ベクター導入群において有意に高いことを確認した（図 7-B）。一方、GFP 発現ベクター導入の対照群と GFP-CD40L 発現ベクター導入群において、等しい GFP 発現を認めた。

以上より、GFP-CD40L 発現 HCEM の樹立に成功した。

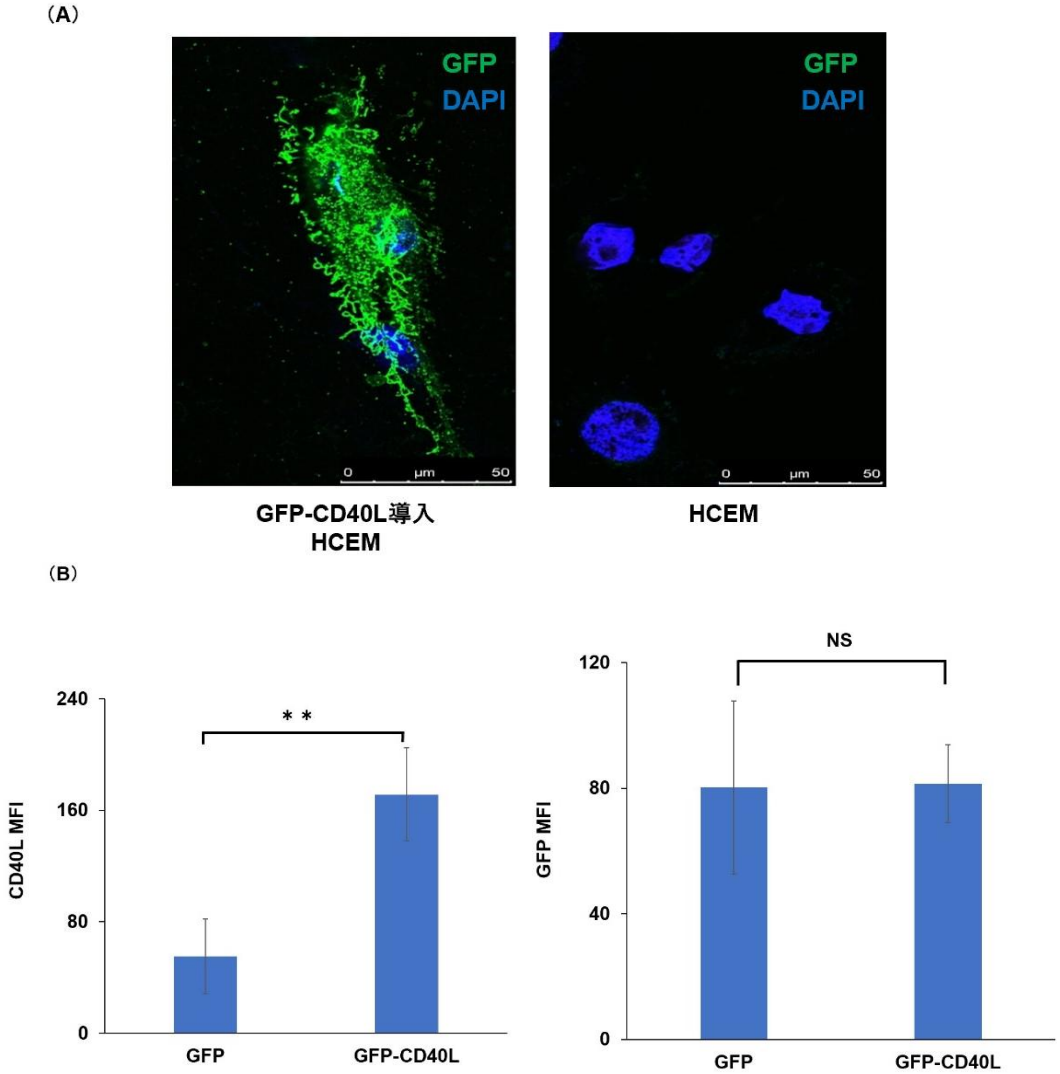


図 7　GFP-CD40L 発現遺伝子導入 HCEM の作製

遺伝子導入システム Neon®を用いて、HCEM に GFP-CD40L 発現プラスミドベクターをエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。

（A）　HCEM の GFP 発現を共焦点顕微鏡にて観察した画像（×400）を示す。
左：GFP-CD40L 導入 HCEM　右：遺伝子非導入 HCEM
青：DAPI、緑：GFP　スケールバー：50 μm

（B）　GFP-CD40L 発現 HCEM のタンパク発現の蛍光強度（MFI）を、フローサイトメーターを用いて検討した結果を示す。対照群には、GFP 発現プラスミドベクターを導入した HCEM を用いた。
左：CD40L、右：GFP、n= 3±標準偏差　＊＊p<0.01

8. 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検討

歯根膜はヘテロな細胞集団で構成されており、その中には、分化能を持たない線維芽細胞に分化した歯根膜線維芽細胞（hPDF）と、骨芽細胞やセメント芽細胞といった硬組織形成細胞への分化能を有する前駆細胞である歯根膜幹細胞（hPDS）から成る。そこで次に我々は、歯周組織にメカニカルストレスが付与された際、これらの異なる形質を示す歯根膜細胞とセメント芽細胞間に作用する CD40-CD40L 相互作用が歯周組織のリモデリングに寄与するのではないかとの仮説を立てて、この点について検証することにした。

実験に先立ち、hPDF、hPDS 及び HCEM の有する特徴について検討した。石灰化誘導培地を用いて硬組織形成細胞への分化誘導を行い、ALP 活性と硬組織形成能の検討を行った。ALP 活性測定の結果、HCEM および hPDS では Day 0 と比較して経時的な ALP 活性の上昇を認めたが、hPDF は ALP 活性の上昇を認めなかった（図 8-A）。hPDF、hPDS 及び HCEM に対し、石灰化誘導培地を用いて硬組織形成細胞へ分化誘導した過程における、石灰化関連遺伝子の mRNA 発現を Real-Time PCR 法を用いて解析した。その結果、*RUNX2* の mRNA 発現は、hPDF と比較して hPDS において有意に高い発現を示した。一方、HCEM は有意に低い発現を示した。*OCN* mRNA 発現については、hPDF と比較して、HCEM において有意に高い mRNA 発現を示した。*POSTN* の mRNA 発現に関しては、hPDF 及び HCEM と比較して、hPDS において有意に高い mRNA 発現を認めた（図 8-B）。アリザリン染色の結果、hPDF は石灰化ノジュールの形成を認めなかったが、hPDS 及び HCEM では石灰化ノジュールの形成を確認した（図 8-C 左）。さらに、プレートを占める石灰化物の密度を定量解析した結果、hPDF と比較して、hPDS および HCEM では有意に高い石灰化物の形成を認めた（図 8-C 右）。

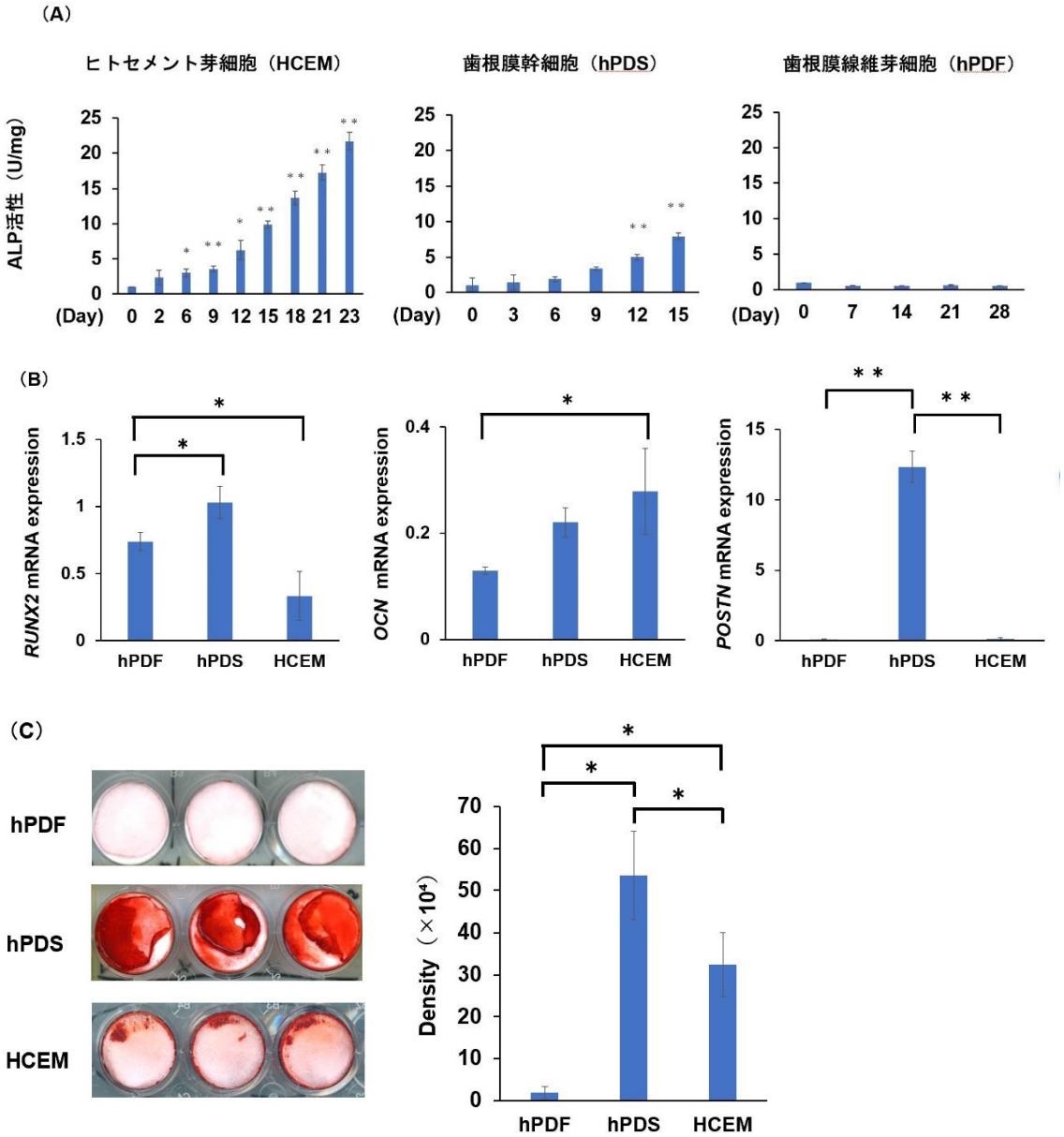


図８　歯根膜線維芽細胞（hPDF）、歯根膜幹細胞（hPDS）及びヒトセメント芽細胞（HCEM）の硬組織形成細胞への分化能における特徴

hPDF、hPDS および HCEM を、石灰化誘導培地を用いて硬組織形成細胞へと分化誘導した。

(A)　hPDF、hPDS および HCEM を硬組織形成細胞に分化誘導した際の ALP 活性を経時的に測定した結果を示す。n= 3±標準偏差　＊p<0.05　＊＊p<0.01

(B)　hPDF、hPDS および HCEM の硬組織形成細胞への分化誘導過程における *RUNX2*、*OCN* および *POSTN* の mRNA 発現について、Real-Time PCR 法を用いて検討した結果を示す。n= 3±標準偏差　＊p<0.05　＊＊p<0.01

(C)　hPDF（上段）、hPDS（中段）および HCEM（下段）を硬組織形成細胞へ分化誘導した際の石灰化ノジュールの形成を、アリザリンレッド染色を用いて検討した結果を示す。

形質の異なるこれらの細胞を用いて、歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L の相互作用が細胞毒性に及ぼす影響について検討した。すなわち、先に樹立した、CD40L 発現 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た。また、対照群として、GFP 発現 HCEM と歯根膜細胞を共培養した。共培養 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た。フローサイトメトリー解析の結果、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 発現ベクター導入 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った（図 9-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なかった（図 9-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った。

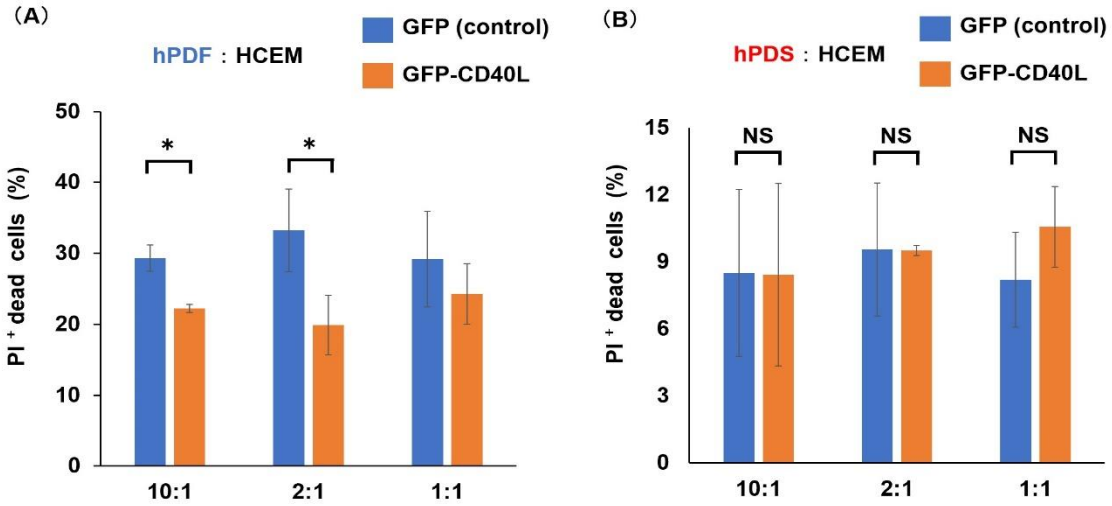


図 9　歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L 間の相互作用が細胞毒性に及ぼす影響

GFP もしくは GFP-CD40L 発現 HCEM と、歯根膜細胞を異なる割合で共培養し、48 時間後にフローサイトメーターを用いてヨウ化プロピジウム（PI）陽性の死細胞の割合を計測した。

（A）　hPDF と HCEM を共培養した際の PI 陽性細胞の割合を示す。
青：GFP 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 HCEM
n= 3±標準偏差　＊p<0.05

（B）　hPDS と HCEM を共培養した際の PI 陽性細胞の割合を示す。青：GFP 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 HCEM
n= 3±標準偏差、NS=not significant

9. 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

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 発現 HCEM を 2：1 の割合で共培養し、48 時間後に BrdU アッセイを行った。対照群には、hPDF または hPDS と、GFP 発現 HCEM を共培養した細胞を実験に供した。BrdU アッセイの結果、対照群と比較して、GFP-CD40L 発現ベクター導入 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った（図 10-A）。一方、hPDS と HCEM を共培養した際の細胞増殖率については、両群で差を認めなかった（図 10-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った。

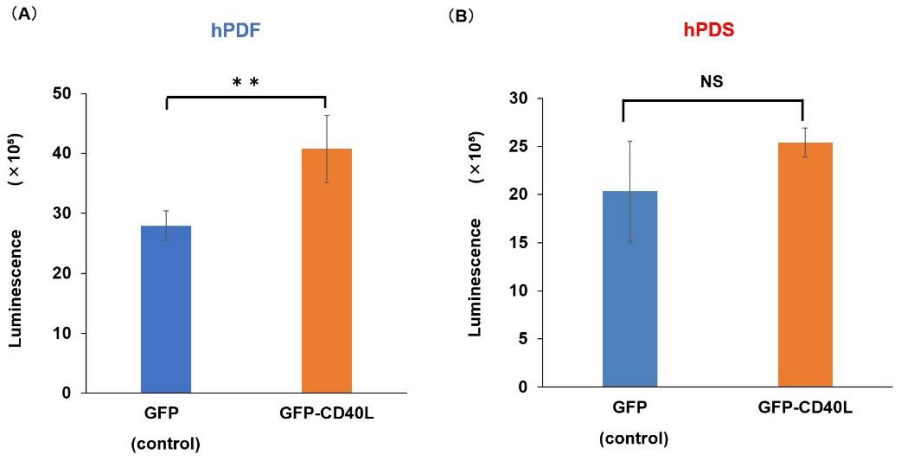


図 10　歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L 間の相互作用が細胞増殖に与える影響

歯根膜細胞と、GFP もしくは GFP-CD40L 発現 HCEM を 2：1 の割合で共培養し、48 時間後に BrdU アッセイにて細胞増殖能を検討した。

（A）　hPDF と HCEM を共培養した際の細胞増殖能を示す。
青：GFP 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 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を示す。
青：GFP 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 HCEM
n= 3±標準偏差 NS=not significant

10. 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

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 CD40L 発現 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た。また、対照群として、GFP 発現 HCEM と歯根膜細胞を共培養した。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 法を用いて検討した。

Real-Time PCR 解析の結果、分化能を持たない hPDF と GFP-CD40L 遺伝子導入 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 発現に変化を認めなかった（図 11-A）。一方、対照群と比較して、hPDS と GFP-CD40L 遺伝子導入 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った。（図 11-B）

また、歯根膜細胞の CD40 と sCD40L の相互作用が硬組織形成能に及ぼす影響についても検討した。hPDS を sCD40L（0 μg, 10 μg, 100 μg, 1000 μg）を 3 日おきに添加した石灰化誘導培地を用いて硬組織形成細胞へと分化誘導し、18 日後、21 日後、24 日後の石灰化関連遺伝子（*RUNX2*、*ALP*）の mRNA 発現変化を Real-Time PCR 法を用いて解析した。対照群には sCD40L を添加していない培養群を用いた。Real-Time PCR 解析の結果、培養 21 日後に対照群と比較して 1000 μg の sCD40L 添加群において *RUNX2* の mRNA 発現が有意に低下した。また、*ALP* mRNA 発現に関しては、対照群と比較して、培養 21 日後の 100 μg 及び 1000 μg sCD40L 添加群と、培養 24 日後の 1000μg sCD40L 添加群において *ALP* mRNA 発現が有意に減少した。（図 11-C）
このことから、歯根膜細胞の CD40 を sCD40L で刺激した場合には、細胞の石灰化関連遺伝子の発現が上昇しないことが明らかとなった。

以上の結果より、hPDS と HCEM 上の CD40-CD40L 相互作用は、メカニカルストレス存在下の歯周組織のリモデリングにおいて、硬組織形成細胞への分化を促進することが示唆された。

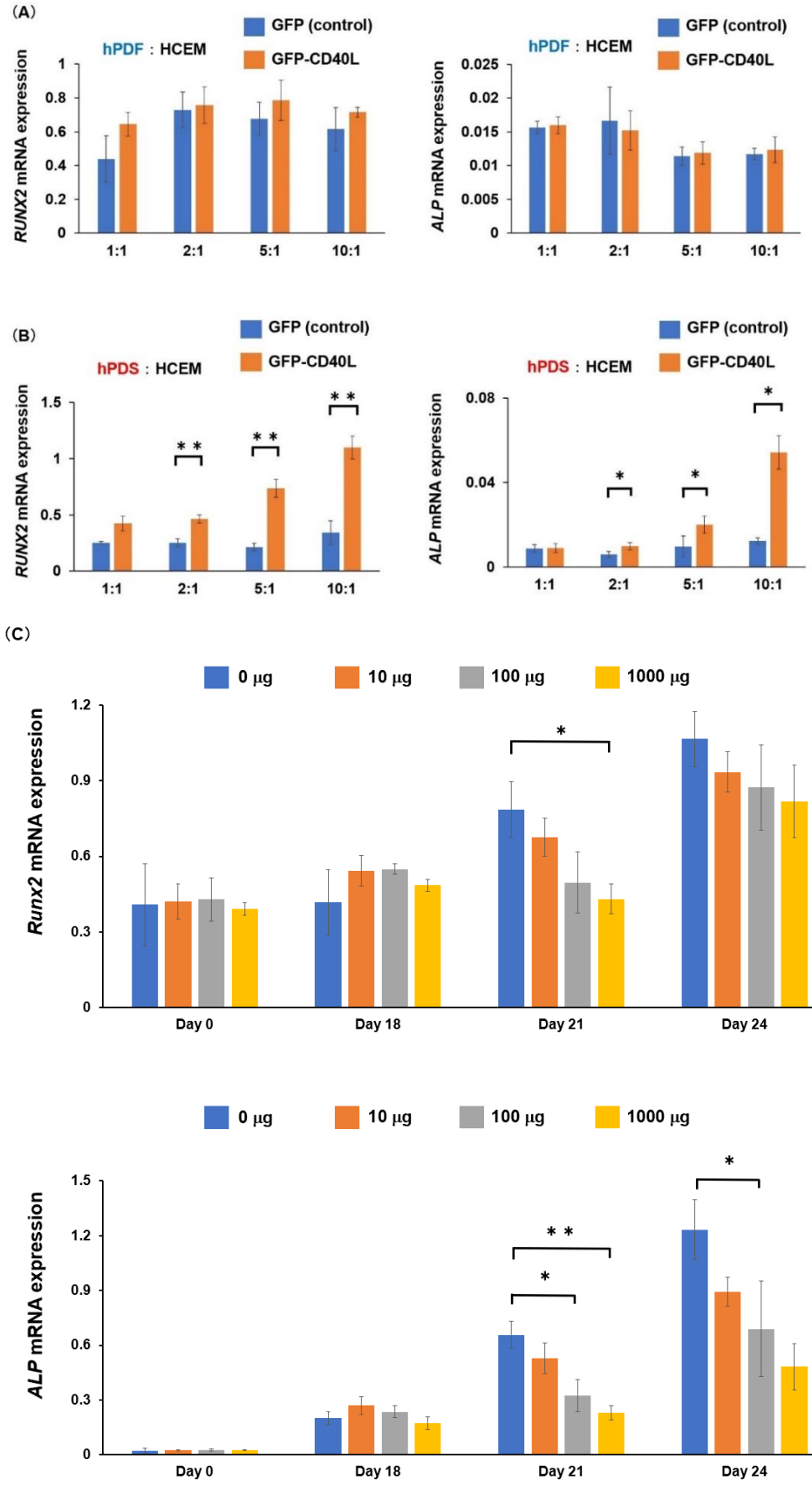

(A)
hPDF : HCEM
GFP (control)
GFP-CD40L
RUNX2 mRNA expression
ALP mRNA expression
1:1
2:1
5:1
10:1
(B)
hPDS : HCEM
GFP (control)
GFP-CD40L
RUNX2 mRNA expression
ALP mRNA expression
(C)
0 μg
10 μg
100 μg
1000 μg
Runx2 mRNA expression
ALP mRNA expression
Day 0
Day 18
Day 21
Day 24

図 11　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

歯根膜細胞と、GFP もしくは GFP-CD40L 発現 HCEM を共培養した 72 時間後の *RUNX2*、*ALP* の mRNA 発現を Real-Time PCR 法にて解析した結果を示す。

（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 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 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 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 HCEM
n= 3±標準偏差　＊p<0.05　＊＊p<0.01

（C）hPDS を石灰化誘導培地を用いて硬組織形成細胞へと分化誘導する過程において、0 μg, 10 μg, 100 μg, あるいは 1000 μg の sCD40L で 3 日おきに hPDS を刺激した。18 日、21 日、24 日後の hPDS における *RUNX2*（上段）、*ALP*（下段）の mRNA 発現を Real-Time PCR 法にて解析した結果を示す。n= 3±標準偏差　＊p<0.05　＊＊p<0.01

11. 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外マトリックス（ECM）産生に与える影響

歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程において、細胞外マトリックス（ECM）の産生が促進することにより、歯根膜の恒常性維持や再生が誘導されることが報告されている[20]。そこで次に、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 法を用いて解析した。Real-Time PCR 解析の結果、hPDF と GFP-CD40L 発現 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 発現に変化を認めなかった（図 12-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 発現 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た。(図 12-B)。

以上の結果より、メカニカルストレス存在下の歯周組織において、hPDS と HCEM の CD40-CD40L の相互作用は、ECM 産生を促進させることが明らかとなった。

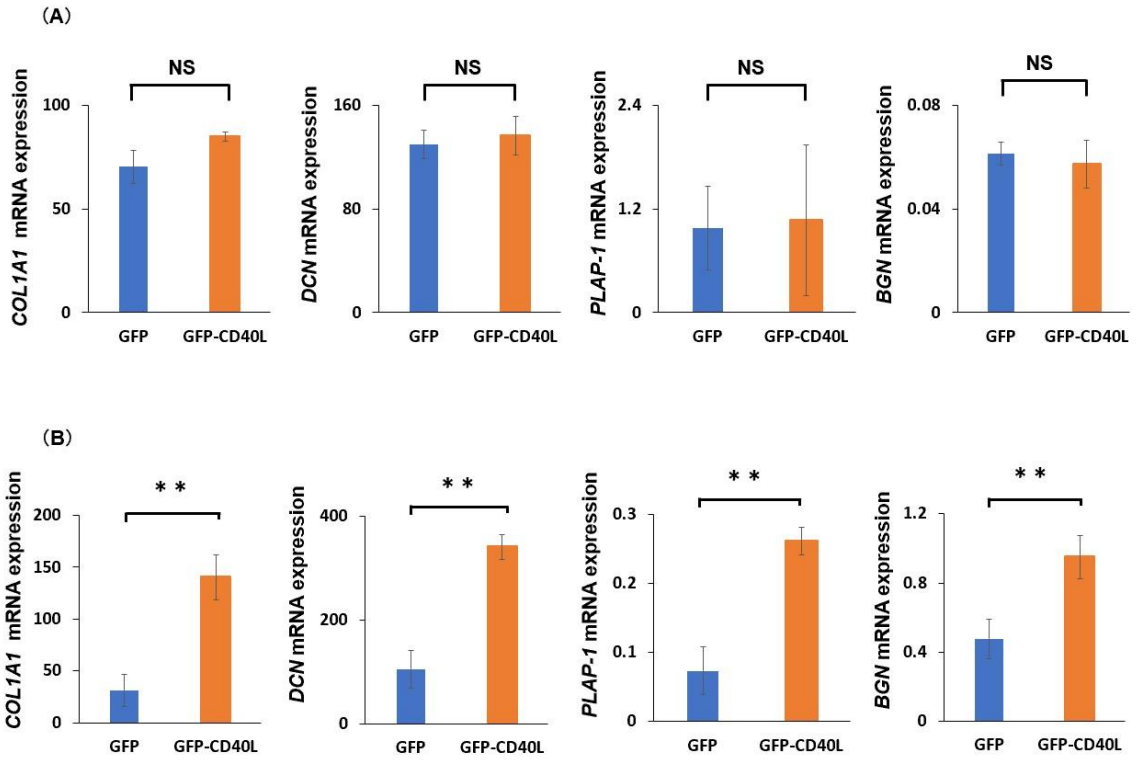


図 12　歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L 間の相互作用が ECM 産生能に与える影響

歯根膜細胞と、GFP もしくは GFP-CD40L 発現 HCEM を共培養し、72 時間後の *COL1A1*、*DCN*、*PLAP-1*、*BGN* の mRNA 発現を Real-Time PCR 法にて解析した結果を示す。

（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 発現を示す。
青：GFP 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 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 発現を示す。
青：GFP 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 HCEM
n= 3±標準偏差　＊＊p<0.01

12. hPDS における内在性 *CD40* の mRNA の発現レベル

これまでの結果より、異なる形質を持つ二種の歯根膜細胞がセメント芽細胞と CD40-CD40L を介して相互に作用することで、異なる機能を誘導することが明らかとなった。そこで次に、CD40-CD40L 相互作用が異なる歯根膜細胞を介して異なる機能を誘導するメカニズムを明らかにするために検討を進めることにした。

まず、異なる機能が hPDF と hPDS の *CD40* mRNA の発現レベルの差に起因する可能性について検討するために、hPDF と hPDS の *CD40* mRNA 発現を Real-Time PCR 法にて解析した。Real-Time PCR 解析の結果、hPDS と比較して、hPDF は有意に低い *CD40* mRNA 発現を示すことが明らかとなった（図 13）。

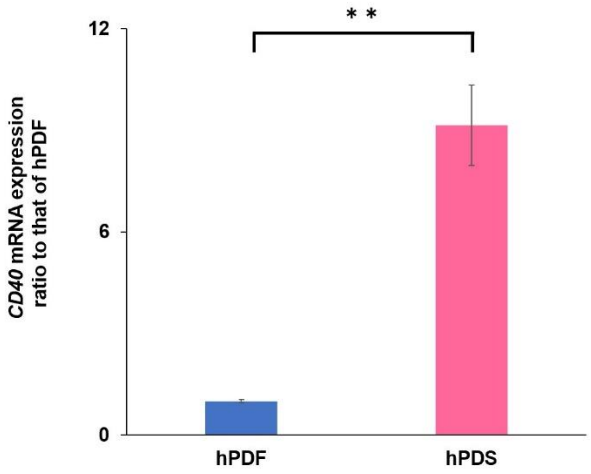


図 13　hPDF および hPDS における内在性 *CD40* の mRNA 発現レベルの比較

hPDF および hPDS より全 RNA を抽出し、各細胞における内在性 *CD40* mRNA 発現レベルを Real-Time PCR 法を用いて検討した結果を示す。結果は hPDF の *CD40* mRNA を基準とした hPDS の *CD40* mRNA 発現の割合を示す。

n= 3±標準偏差　＊＊p <0.01

13.　CD40 遺伝子導入 hPDF の作製

Real-Time PCR 解析の結果より、*CD40* の発現が、hPDS と比較して hPDF では低いことが明らかとなったので、次に、hPDF において CD40 を強発現させることで、hPDS と同様の機能が発現できるのか否かについて検討を進めることにした。この検討に先立ち、CD40 強発現 hPDF を樹立した。すなわち、遺伝子導入システム Neon®を用いて、OFP-CD40 発現プラスミドベクターを hPDF に遺伝子導入した。そして、OFP-CD40 発現 hPDF の CD40 のタンパク発現レベルを、フローサイトメーターを用いて検討した。また、対照群には、同様の方法で OFP 発現ベクターを hPDF に遺伝子導入した細胞を用いた。フローサイトメトリー解析の結果、CD40 のタンパク発現は対照群と比較して OFP-CD40 導入 hPDF において有意に高い発現を示した。一方、OFP のタンパク発現は対照群と比較して OFP-CD40 導入 hPDF で有意に低い発現を認めた（図 14）。

以上より、CD40L 強発現 hPDF の樹立に成功した。

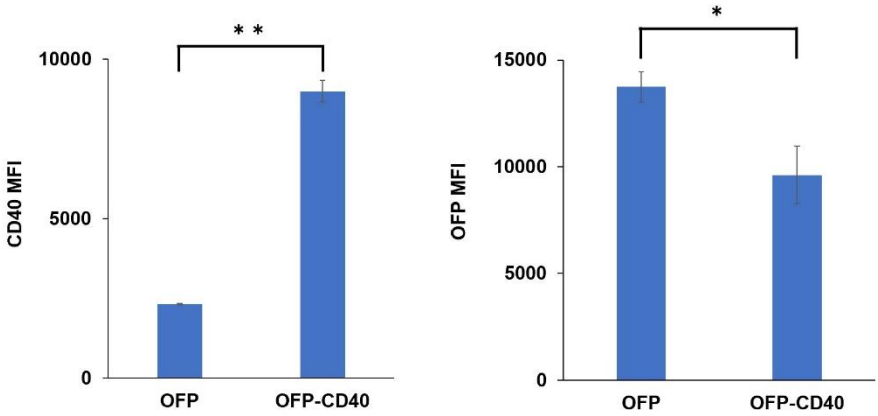


図 14　CD40 遺伝子導入 hPDF の作製

遺伝子導入システム Neon®を用いて、hPDF に OFP-CD40 発現プラスミドベクターをエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。対照群には、OFP 発現プラスミドベクターを遺伝子導入した hPDF を用いた。CD40 または OFP のタンパク発現レベルを、フローサイトメーターを用いて検討した結果を示す。
n= 3±標準偏差　＊p<0.05　＊＊p<0.01

14.　CD40 強発現歯根膜細胞と CD40L 発現セメント芽細胞の相互作用が細胞の *RUNX2*　mRNA 発現に及ぼす影響

次に、先に樹立した CD40 強発現 hPDF を用いて、CD40 発現レベルの差が CD40-CD40L 相互作用の誘導する機能にどのような影響を及ぼすのかについて検討を行った。すなわち、OFP-CD40 発現 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。図 12-A と同様に、CD40 高発現の hPDS と GFP-CD40L 遺伝子導入 HCEM を共培養すると、対照群と比較して、*RUNX2* mRNA の有意に高い発現を認めた（図 15-A）。一方、GFP もしくは GFP-CD40L 導入 HCEM と OFP-CD40 発現 hPDF の共培養においては、両群で *RUNX2* の mRNA 発現に差を認めないことが明らかとなった（図 15-B）。

以上より、CD40 の発現レベルに関係なく、CD40-CD40L 相互作用は、異なる歯根膜細胞を介して、歯周組織において異なる機能を発揮することが明らかとなった。

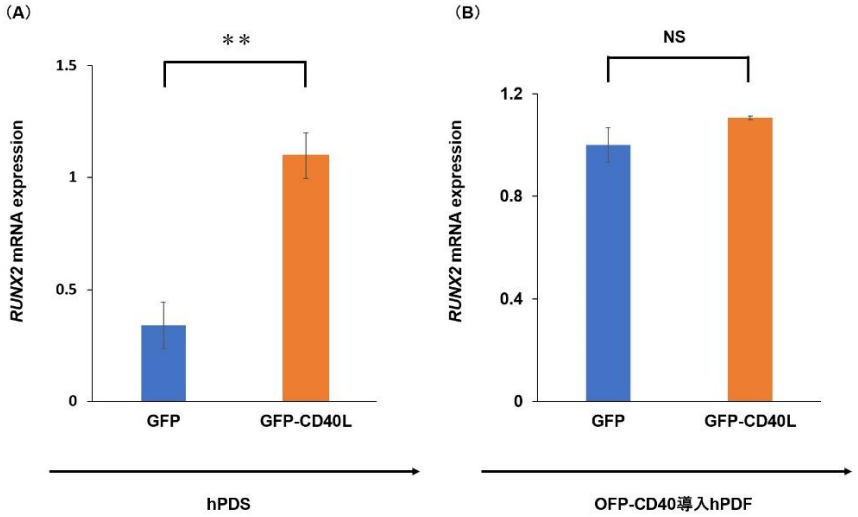


図 15　CD40 強発現歯根膜細胞と CD40L 発現セメント芽細胞の相互作用が *RUNX2*　mRNA 発現に及ぼす影響

歯根膜細胞と、GFP もしくは GFP-CD40L 発現 HCEM を共培養し、72 時間後の *RUNX2* mRNA 発現を Real-Time PCR 法を用いて検討した結果を示す。

（A）hPDS と GFP または GFP-CD40L 遺伝子導入 HCEM を共培養した際の *RUNX2* mRNA 発現を示す。

（B）OFP-CD40 発現 hPDF と GFP または GFP-CD40L 遺伝子導入 HCEM を共培養した際の *RUNX2* mRNA 発現を示す。

青：GFP 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 HCEM　n= 3±標準偏差

＊＊p <0.01 NS=not significant

15.　歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L 間の相互作用が炎症性サイトカイン産生能に与える影響

図 3 より、sCD40L 刺激は歯根膜細胞における TNF-a および IL-6 の産生を有意に促進することが明らかとなっている。そこで次に、セメント芽細胞上の CD40L が歯根膜細胞上の CD40 と相互作用した際に、炎症性サイトカインの１つである *IL-6* mRNA 発現にどのような影響を及ぼすのか検討した。歯根膜細胞とセメント芽細胞を 2：1 の割合で共培養し、*IL-6* mRNA の発現変化を Real-Time PCR 法を用いて解析した。Real-Time PCR 解析の結果、hPDF と GFP-CD40L 発現 HCEM の共培養と、対照群である hPDF と GFP 発現 HCEM との共培養との間で、*IL-6* mRNA の発現レベルに有意な差を認めなかった（図 16-A)。一方、対照群と比較して、GFP-CD40L 発現 HCEM と hPDS の共培養群において、*IL-6* mRNA 発現が有意に低下することが明らかとなった（図 16-B)。

以上の結果より、歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L の相互作用は、炎症性サイトカインである *IL-6* mRNA の発現を上昇させないことが明らかとなった。

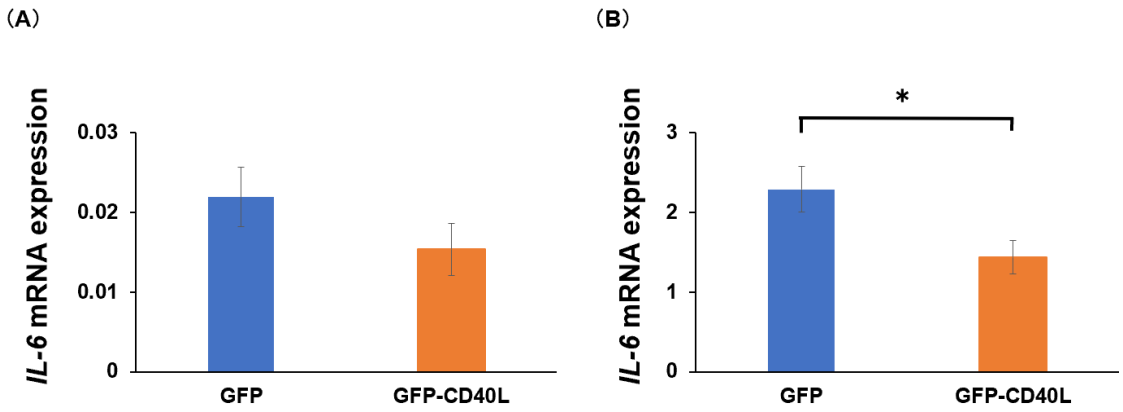


図 16　歯根膜細胞の CD40 とセメント芽細胞の CD40L 間の相互作用が炎症性サイトカイン産生能に与える影響

歯根膜細胞と、GFP もしくは GFP-CD40L 発現 HCEM を共培養した際の *IL-6* の mRNA 発現を Real-Time PCR 法にて解析した結果を示す。

（A）hPDF と HCEM を 2：1 の比率で共培養した際の *IL-6* の mRNA 発現を示す。青：GFP 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 HCEM　n= 3±標準偏差

（B）hPDS と HCEM を 2：1 の比率で共培養した際の *IL-6* の mRNA 発現を示す。青：GFP 導入 HCEM、橙：GFP-CD40L 導入 HCEM

n= 3±標準偏差　＊p <0.05

考察

本研究では、歯周組織における CD40-CD40L の相互作用の生物学的機能について、病態及び生物学的側面の２つの観点から検討を行った。その結果、歯周炎のような病態下の歯周組織では、CD40-CD40L の相互作用は炎症性サイトカインの産生を促進することにより、同組織の炎症を増悪させ、歯周炎の慢性化を引き起こす可能性が示唆された。一方、生理的状態における歯周組織では、CD40-CD40L 相互作用は、歯根膜を構成する細胞の生存、増殖及び分化を促進することにより、歯周組織の代謝、特にセメント質の代謝、に寄与することが示唆された。

一般的に、CD40-CD40L 相互作用は、活性化 T 細胞と B 細胞間で惹起される免疫反応を誘導し、ヒトにおいて *CD40* または *CD40L* 遺伝子が欠損あるいは変異すると、X 染色体連鎖性の高 IgM 血症が誘発されることが知られている[1]。また、CD40-CD40L 相互作用は、アテローム性動脈硬化症、炎症性腸疾患や関節炎といった炎症性の疾患を引き起こすことが知られている[21-22]。一方、CD40 あるいは CD40L のノックダウンもしくはノックアウトマウスにおいては、炎症組織における免疫細胞の浸潤が減少することにより、過度の炎症反応が抑制され、上記に挙げた疾患の発症や進行が抑制されることが報告されている[22-23]。

CD40 は免疫細胞のみならず、内皮細胞や皮膚および滑膜の線維芽細胞にも発現しており、これらの細胞において CD40 シグナルが活性化すると、炎症誘導性遺伝子および接着因子の発現が亢進することが報告されている[24-25]。これまでに、歯肉線維芽細胞および歯根膜細胞において、CD40 が恒常的に発現していることが報告されており、歯周炎によって、これら細胞の CD40 発現が著明に上昇することが報告されている[10]。このことは、本研究の CD40-CD40L 相互作用が、炎症性サイトカインの産生を促進させ、組織の炎症を持続させる（図 3 と図 4）という結果と一致している。

歯周組織は、生理的状態において咬合力などのメカニカルストレスに常に晒されている[26]。今回、我々は、メカニカルストレス存在下の CD40-CD40L の相互作用の機能を解析するにあたり、マウスの第一臼歯近心移動モデルマウスを用いた（図 6-A）。Alhashimi らは、矯正力等を付与していない正常な咬合状態においても、CD40 分子が歯根膜細胞に恒常的に発現していることを報告してい

る。さらに、Alhashimi らは、生理的な範囲で歯に矯正力を付与すると CD40 の発現が著明に上昇することを明らかにしている[11]。これらのことから、メカニカルストレス応答性 CD40-CD40L 相互作用の歯周組織における機能を解析するにあたり、マウス第一臼歯近心移動モデルを使用することは有用であると判断した。一般的に、歯に矯正力が付与された歯周組織では、圧迫側において、組織に存在する細胞のアポトーシスや破骨細胞の誘導により、歯槽骨の吸収が起こる[26]。一方、牽引測においては、細胞の増殖や分化が誘導されることにより、セメント質及び歯槽骨の添加が起こる[26]。これまでの研究より、矯正力により、CD40 陽性歯根膜細胞と歯周組織の微小環境を構成する細胞において、CD40-CD40L 相互作用が誘導されることが示唆されてきたが、その機能の詳細については不明であった。本研究より、硬組織吸収を行う多核巨細胞やセメント芽細胞上の CD40L の発現が、矯正力によって誘導されることが明らかとなった（図 5）。また、歯槽骨表面に存在する破骨細胞や骨芽細胞においても、CD40L の発現を認めた（図 5-C）ことから、圧迫側では、CD40L 陽性の破骨細胞あるいは CD40L 陽性破歯細胞と、CD40 陽性歯根膜細胞間の相互作用より、骨や歯根の吸収が誘導される可能性が考えられる。一方、牽引測においては、CD40L 陽性セメント芽細胞あるいは CD40L 陽性骨芽細胞と、CD40 陽性歯根膜細胞の相互作用より、骨やセメント質の添加が誘導される可能性が示唆される。本研究では、圧迫側では、12 日間の持続的な圧迫刺激により、組織において歯根膜細胞が消失していたこと、並びに、骨芽細胞と比較して、セメント芽細胞において高い CD40L 発現を認めた事を考慮し、牽引測において誘導される歯根膜細胞とセメント芽細胞間の CD40-CD40L を介した相互作用に着目することにした。

本研究では、10 g の矯正力をマウスの第一臼歯に加えることで、歯周組織にメカニカルストレスを付与した。一般的に、マウスの歯に矯正力を付与する際には、10～30 g の力が組織損傷を起こさない力とされている[27-28]。これらの報告より、我々が用いた矯正力は、歯周組織に為害性を与えない範囲の力であると判断される。さらに、本研究では、*in vitro* にて機能解析を行うために、培養細胞に伸展力を付与する実験系を用いた。本 *in vitro* 実験では、10 %、0.5 Hz の伸展力を負荷した。一般的に、*in vitro* において、歯根膜細胞に生理学的な範囲内で加えられるメカニカルストレスは 10 %、0.1~0.5 Hz である[13,29]。一方、*in vitro* でセメント芽細胞に伸展刺激を付与した実験はこれまでにほとんど報告が

なく、Li が 2000 μstrain のひずみ単位で伸展力を負荷した実験が挙げられるのみである[30]。そこで、本研究においては、セメント芽細胞に類似した骨芽細胞において用いられている、8 %～12 %の伸展力に倣い、セメント芽細胞の伸展実験を行った[31-32]。本 *in vitro* 実験を推進するにあたり、細胞を 72 時間以上伸展すると、細胞がストレッチチャンバーから剥がれ、以降の機能解析が困難であった。そこで、本研究では、HCEM に CD40L を遺伝子導入することで、伸展力が負荷された状態を模して実験を遂行した。本研究で遺伝子導入法により樹立した GFP-CD40L HCEM は、図 7 より高い CD40L 発現を示すことを確認しているが、そのトランスフェクション効率は 100 %ではない。それ故、これら *in vitro* 実験に供したセメント芽細胞の CD40L 発現レベルが、*in vivo* におけるセメント芽細胞の CD40L 発現をどの程度反映しているのかについては十分な考察が必要である。また、本研究で作製した CD40L 遺伝子導入 HCEM は CD40L を一過性に発現するため、0～3 日程の短期間しか CD40L を強発現することができない。一方、*in vivo* では、12 日間という長期的な矯正力で、セメント芽細胞に誘導された CD40L 分子の発現を観察している。これら *in vitro* と *in vivo* における CD40L の発現レベルや発現期間の相違は、本実験系の限界点として考慮すべき点として挙げられる。

歯周組織は、歯肉、歯槽骨、セメント質及び歯根膜の 4 つの組織で構成されており、中でも、歯根膜は、コラーゲンなどの各種 ECM や組織を構成する線維芽細胞をはじめとする「歯根膜細胞」と総称される様々な細胞成分により構成されている[33]。Saito らが報告しているように、歯根膜には、*RUNX2* 陽性の硬組織形成能を有する細胞が豊富に存在しており、全歯根膜細胞の 60~70 %を占める[34]。これらの細胞は歯根膜の微小環境の変化に応じて、骨芽細胞やセメント芽細胞に分化する能力を持つ。一方、歯根膜には、*COL1A1* 陽性 *RUNX2* 陰性の線維芽細胞様の細胞も存在しており、結合組織様組成として、歯根膜はメカニカルストレスを緩衝する役割を担う[34]。そこで、本研究では、これらの異なる形質を示す歯根膜細胞の歯根膜由来初代培養細胞を用いて実験を行った。すなわち、図 1 に示す通り、石灰化誘導にて、ALP 活性の上昇及びアリザリン染色陽性を示す、石灰化能を有する細胞を歯根膜幹細胞（hPDS）と定義した。一方、石灰化誘導に対して、ALP 活性の上昇を認めず、アリザリン染色陰性の細胞を歯根膜線維芽細胞（hPDF）と定義して実験に供した。Saito らは、歯根膜組織の *in situ*

hybridization により、歯根膜細胞、セメント芽細胞及び骨芽細胞のマーカー遺伝子を検討した。その結果、歯根膜には、*RUNX2*$^{+}$ *POSTN*$^{+}$ の歯根膜細胞が豊富に存在すること、並びに、セメント芽細胞や骨芽細胞は、*POSTN*$^{-}$ *OCN*$^{+}$ な細胞であることを明らかにしている [34]。図 8-B の結果より、本研究で用いた歯根膜細胞（hPDS）は、*RUNX2*$^{+}$、*POSTN*$^{+}$、*OCN*$^{-}$ の特徴を示し、HCEM は、*POSTN*$^{-}$、*OCN*$^{+}$ の特徴を示した。これらの cell line の特徴は、Saito らの結果と類似している。

これまでの報告より、B 細胞上に発現する CD40 と活性化した T 細胞上に発現する CD40L が相互作用すると、B 細胞の CD40 を介するシグナル伝達により、B 細胞のアポトーシスが阻害される。また、これと同時に、B 細胞の活性化及び、増殖が誘導されることが明らかとなっている [2]。本研究においても、図 9 と図 10 より、歯根膜細胞とセメント芽細胞間の CD40-CD40L を介した相互作用は、細胞の生存や増殖を促進させた。これらの作用は、B 細胞と T 細胞間で認める CD40-CD40L の作用と一致している。さらに、これらの結果は、歯根膜細胞の総数が増えることにより、伸展力により拡大した歯根膜の領域を補填することを示唆する。このことは、歯根膜の細胞が増殖することで、その総数が増加する可能性と、同細胞の生存が延長することで、結果としてその総数が増加する可能性を示す。本研究では、増殖能の検討に BrdU アッセイを用いた。BrdU は、細胞周期の S 期を特異的に検出するため、DNA 合成期にある細胞の割合を同定することが可能となる [35]。すなわち、本研究の結果は、CD40-CD40L の相互作用により、歯根膜またはセメント芽細胞が増殖していることを示す。一方、細胞生存能の評価には、PI 染色を用いた。PI 染色は、細胞膜が障害されることで、細胞内に取り込まれ、核内 DNA にキレートされる [36]。すなわち、PI 染色により細胞膜が破壊された死細胞を検出することができる。本研究では、図 9 より、CD40-CD40L 相互作用は、歯根膜細胞またはセメント芽細胞への傷害を減少させることが明らかとなった。しかしながら、これらの生存細胞の寿命がどの程度の期間なのかについては今後の検討課題である。今後、生細胞をラベルする Hoechst334L を用いた生細胞のタイムコース実験を行い、この点について明らかにする必要があると考えている。

本研究の図 9 から図 12、及び図 15 の結果は、共培養したセメント芽細胞と歯根膜細胞の集合体における機能を表している。そのため、各図に示した結果が、

いずれの細胞に由来する機能であるのかは明らかではない。しかしながら、いずれの結果においても、hPDS と HCEM の共培養と hPDF と HCEM の共培養で異なる結果が得られていることから、両実験に共通して用いた HCEM 由来の機能ではなく、hPDS あるいは hPDF に由来する機能ではないかと我々は推察する。今後は、GFP で標識された HCEM を GFP によって gating または sorting することにより、各細胞別の機能を検討する必要があると考えている。

本研究の結果より、歯周組織において CD40-CD40L の相互作用が異なる機能を誘導するメカニズムに CD40 の発現レベルは関与しないことが明らかとなった。図 3 より、sCD40L で CD40 陽性歯根膜細胞を刺激すると、TNF-α 及び IL-6 の産生が上昇することが明らかとなった。一方、CD40L 発現 HCEM を hPDS あるいは hPDF と共培養すると、IL-6 mRNA の発現が抑制されることを明らかにしている（図 16）。また、図 15 より、CD40L 発現 HCEM と hPDS を共培養すると、*RUNX2* mRNA の発現上昇を認めたことに対し、CD40L 発現 HCEM を hPDF と共培養しても、対照群と比較して *RUNX2* mRNA 発現に変化は認めなかった。さらに、図 11-C の結果より、hPDS を sCD40L 存在下で石灰化誘導培地にて硬組織形成細胞へと分化誘導すると、同細胞における *RUNX2* mRNA 発現が sCD40L 濃度依存的に抑制されることを明らかにしている。以上のことから、CD40-CD40L 相互作用によって誘導される機能の差は、CD40 の発現レベルによるものではなく、CD40 と CD40L 発現細胞の組み合わせによって細胞内に誘導される CD40 シグナルに起因するのではないかと推察する。CD40L 刺激により細胞内に誘導される CD40 のシグナル経路には、NF-κβ 経路と MAP キナーゼ経路の二種が存在する。CD40 のシグナルが細胞内に伝達されると、TRAF 1,2,3,5,6,のアダプター蛋白がリクルートされる[2-3]。リクルートされる TRAF 蛋白に依存して、炎症反応を促進させる NF-κβ経路のリン酸化が誘導されるのか、あるいは、細胞の増殖、分化、アポトーシス等を誘導する MAP キナーゼ経路のリン酸化が誘導されるのかが決まる[37]。現在、我々は、本研究で用いた CD40-CD40L 発現細胞の組み合わせが、いずれの TRAF をリクルートするのか、さらに NF-κβ 経路または MAP キナーゼ経路のいずれの経路を活性化するのかをウエスタンブロット法にて明らかにすることを試みている。

今後、歯周組織における CD40-CD40L 相互作用が誘導する機能の全貌、及び

そのメカニズムを明らかにしていくことにより、CD40-CD40L 相互作用の制御が可能となり、CD40 あるいは CD40L 分子をターゲットとした、歯周病の炎症を抑制する歯周病治療薬や、歯周組織の再生誘導を促進する歯周組織再生誘導剤の開発が期待できる。

結論

本研究結果より以下の結論を得た。

1. CD40 を発現している歯根膜細胞は、IL-1βおよび LPS 刺激に応じてその発現が有意に上昇することが明らかとなった。
2. 歯根膜細胞を sCD40L で刺激すると、同細胞からの TNF-αおよびIL–6の産生が有意に上昇することが明らかとなった。
3. *in vivo* において、CD40L 刺激は、マウス皮膚組織の炎症を持続させ、傷の治癒を有意に遅らせることが明らかとなった。
4. *in vivo* において、矯正力によりセメント質表面に存在する細胞において CD40L の発現が誘導された。
5. *in vitro* でセメント芽細胞に伸展刺激を与えると、CD40L 発現が上昇することが明らかとなった。
6. GFP-CD40L 遺伝子導入 HCEM と歯根膜細胞（hPDF もしくは hPDS）の共培養の結果、hPDF との共培養により誘導される CD40-CD40L 相互作用は、細胞の生存率及び細胞増殖率を有意に上昇させた。一方、hPDS との共培養により誘導される CD40-CD40L 相互作用は、細胞の石灰化および ECM 関連遺伝子の mRNA 発現を有意に上昇させた。
7. CD40 強発現 hPDS と GFP-CD40L 遺伝子導入 HCEM を共培養すると、*RUNX2* mRNA の有意な発現上昇を認めた。一方、CD40 強発現 hPDF と GFP-CD40L 遺伝子導入 HCEM を共培養しても、*RUNX2* の mRNA 発現上昇を認めなかった。また、hPDS を sCD40L 存在下で硬組織形成細胞へと分化誘導を行うと、*RUNX2* mRNA の発現が有意に低下することが明らかとなった。

以上のことから、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、歯周病による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応答して、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を促進することが示唆された。また、これら歯周組織の CD40-CD40L 相互作用により誘導される様々な機能は、CD40 発現レベルに依存するのではなく、CD40-CD40L を発現している細胞の組み合わせに依存することが示唆された。

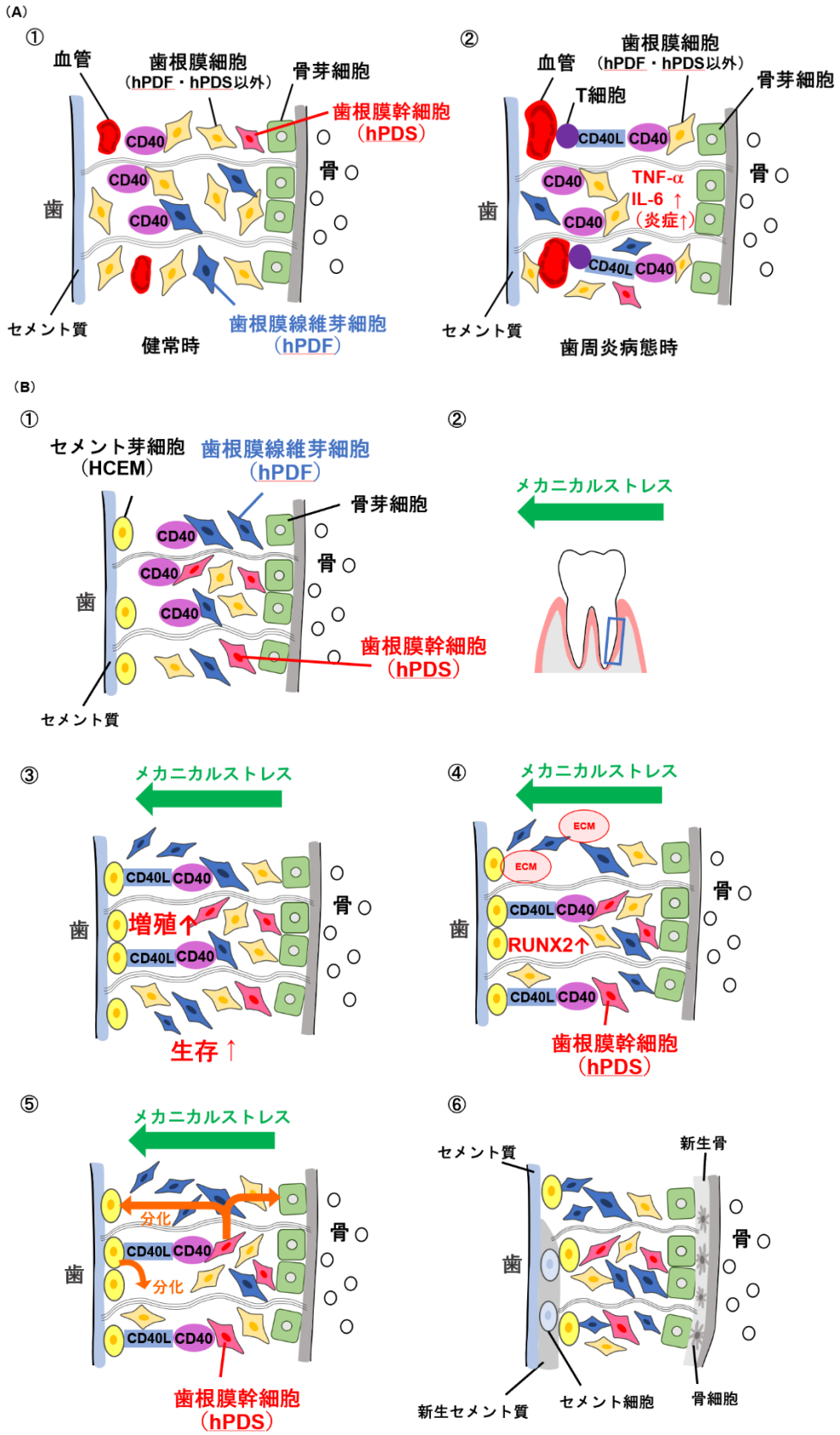

(A)
①
血管
歯根膜細胞
(hPDF・hPDS以外)
骨芽細胞
歯根膜幹細胞
(hPDS)
CD40
歯
骨
セメント質
歯根膜線維芽細胞
(hPDF)
健常時
②
血管
歯根膜細胞
(hPDF・hPDS以外)
骨芽細胞
T細胞
CD40L CD40
TNF-α
IL-6 ↑
(炎症↑)
セメント質
歯周炎病態時
(B)
①
セメント芽細胞
(HCEM)
歯根膜線維芽細胞
(hPDF)
骨芽細胞
歯根膜幹細胞
(hPDS)
セメント質
②
メカニカルストレス
③
メカニカルストレス
CD40L CD40
増殖↑
生存↑
④
メカニカルストレス
ECM
RUNX2↑
歯根膜幹細胞
(hPDS)
⑤
メカニカルストレス
分化
歯根膜幹細胞
(hPDS)
⑥
セメント質
新生骨
新生セメント質
セメント細胞
骨細胞

図 17　歯周組織における CD40-CD40L 相互作用の機能

（A）　歯周組織炎症時における CD40-CD40L 相互作用の機能

① 健常時

② 歯周炎病態時：歯周組織に浸潤した活性化 T 細胞と歯根膜細胞間の CD40L-CD40 相互作用の誘導により、IL-6 及び TNF-α の産生が増加して、炎症が亢進する。

（B）　メカニカルストレスが負荷された歯周組織における CD40-CD40L 相互作用の機能

① ストレス負荷前状態

② マウス第一臼歯に矯正力を負荷。四角部の拡大図を③～⑥に示す。

③ ストレス負荷時 : HCEM と hPDF 間の CD40L-CD40 相互作用の誘導により細胞の増殖能及び生存能が向上する

④ ストレス負荷時 : HCEM と hPDS 間の CD40L-CD40 相互作用の誘導により RUNX2 発現の上昇と ECM 産生が促進する

⑤ ③の結果、細胞の分化が促進する

⑥ セメント質、歯槽骨が新生することで歯周組織の恒常性が維持される

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学　大学院歯学研究科　口腔分子免疫制御学講座　村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。加えて、本研究の進行にあたり直接御指導ならびに御助言を頂きました藤原千春助教に心より感謝申し上げます。また、マウス第一臼歯近心移動の実験にご協力いただきました東北大学歯学研究科 口腔発育学講座 顎口腔矯正学分野 北浦英樹准教授、パラフィン切片画像取得にご協力いただきました大阪大学歯学研究科 顎顔面口腔矯正学教室 犬伏俊博講師、ヒトセメント芽細胞およびヒト歯根膜線維芽細胞をご提供くださった広島大学歯学研究科 口腔顎顔面病理病態学　高田隆前教授（現 名誉教授）に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

1. U. Schönbeck, P. Libby. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Lif Sci.* 2001;58:4 –43
2. C. Kooten, J. Banchereau. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000;67(1):2-17
3. G.A. Bishop, C. R. Moore, P. Xie, et al. TRAF Proteins in CD40 Signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2007;597:131-51
4. J. Tian, T. Zhu, J. Liu, et al. Platelets promote allergic asthma through the expression of CD154. *Cell Mol Immunol.* 2015;12(6):700-7
5. M. Melter, M. Reinders, M. Sho, et al. Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood.* 2000;96(12):3801-8
6. S. Russo, B. Bussolati, I. Deambrosis, et al. Platelet-Activating Factor Mediates CD40-Dependent Angiogenesis and Endothelial-Smooth Muscle Cell Interaction. *J. Immunol.* 2003 ;171 (10) :5489-97.
7. M. Shimono, T. Ishikawa, H. Ishikawa, et al. Regulatory Mechanisms of Periodontal Regeneration. *Microsc Res Tech.* 2003;60(5):491-502
8. M.Tamura, M. Tokuda, S. Nagaoka, et al. Lipopolysaccharides of Bacteroides intermedius (Prevotella intermedia) and Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis Induce Interleukin-8 Gene Expression in Human Gingival Fibroblast Cultures. *Infect Immu.* 1992 ;60(11):4932-7.
9. G. Sempowski, P. Chess, A. Moretti, et al. CD40 Mediated Activation of Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts. *J Periodontol.* 1997 ;68(3):284-92.
10. K. Orima, K. Yamazaki, T. Aoyagi, et al. Differential expression of costimulatory molecules in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(1):153-60.
11. N. Alhashimi, L. Frithiof, P. Brudvik, et al. CD40-CD40L expression during orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 2004;74(1):100-5
12. S. Yamada, M. Tomoeda, Y. Ozawa, et al. PLAP-1/Asporin, a Novel Negative Regulator of Periodontal Ligament Mineralization. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23070-80
13. C. Fujihara, S. Yamada,N. Ozaki et al. Role of Mechanical Stress-induced

Glutamate Signaling-associated Molecules in Cytodifferentiation of Periodontal Ligament Cells. *J Biol Chem.* 2010 ;285(36):28286-97

14. M. Kitagawa, H. Tahara, S. Kitagawa et al. Characterization of established cementoblast-like cell lines from human cementum-lining cells in vitro and in vivo. *Bone.* 2006;39(5):1035-1042
15. M. Okumura, T. Okuda, T. Okamoto et al. Enhanced angiogenesis and granulation tissue formation by basic fibroblast growth factor in healing-impaired animals. *Arzneimittelforschung.* 1996;46(10):1021-6.
16. Z. Hakami, H. Kitaura, K. Kimura et al. Effect of interleukin-4 on orthodontic tooth movement and associated root resorption. *Eur J Orthod.* 2015;37(1):87-94
17. O. Bessey, O. Lowry, M. Brock. A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem.* 1946;164:321-329.
18. L. Dahl, V. Dole. The biphasic nature of renal calcification. *J Exp Med.* 1952;95(4):341-346
19. P. Gonçalves, E. Sallum, A. Sallum et al. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci.* 2004; *4(12),651-8*
20. R. Nohutcu, L. McCauley, A. Koh et al. Expression of Extracellular Matrix Proteins in Human Periodontal Ligament Cells During Mineralization In Vitro. *J Periodontol.* 1997 ;68(4):320-7
21. M. Kawai, A. Masuda, M. Kuwana. A CD40 - CD154 interaction in tissue fibrosis. *Arthtitis Rheumatism.* 2008;58(11), 3562–73
22. N. Senhaji, K. Kojok, Y. Darif, et al. The contribution of CD40/CD40L axis in inflammatory bowel disease: an update. *Front Immunol.* 2015;6:529
23. X. Lei, Y. Ohkawara, M. Stämpfli et al. Disruption of Antigen-induced Inflammatory Responses in CD40 Ligand Knockout Mice. *J Clin Invest.* 1998;101(6):1342-53
24. M. Reinders, M. Sho, A. Izawa et al. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *J Clin Invest.* 2003 ;112(11):1655-65
25. C.S. Cho, M.L. Cho, S.Y. Min, et al. CD40 engagement on synovial fibroblast up - regulates production of vascular endothelial growth factor. *Journal of Immunology.* 2000;164(10), 5055–5061.
26. E. Dutra, R. Nanda, S. Yadav. Bone Response of Loaded Periodontal

Ligament. *Curr Osteoporos Rep.* 2016;14(6):280-283
27. M. Yoshimatsu, Y. Shibata, H. Kitaura et al. Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *J Bone Metab.* 2006;24(1):20-7
28. Y. Wang, Q. Li, F. Liu et al. Transcriptional activation of glucose transporter 1 in orthodontic tooth movement-associated mechanical response. *Int J Oral Sci.* 2018;15;10(3):27
29. Y. Yang, B.K. Wang, M.L. Chang et al. Cyclic Stretch Enhances Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Cells via YAP Activation. *Biomed Res Int.* 2018;5;2018:2174824
30. S.Li, F.Li, S.Zou et al. PTH1R signalling regulates the mechanotransduction process of cementoblasts under cyclic tensile stress. *Eur J Orthod.* 2018;28;40(5):537-543
31. K.W. Yu, C.C. Yao, J.H. Jeng et al. Periostin inhibits mechanical stretch-induced apoptosis in osteoblast-like MG-63 cells. *J Formos Med Assoc.* 2018 ;117(4):292-300
32. J. Gao, S. Fu, Z. Zeng et al. Cyclic stretch promotes osteogenesis-related gene expression in osteoblast-like cells through a cofilin-associated mechanism. *Mol Med Rep.* 2016;14(1):218-24
33. W. Beertsen, C. Mcculloch, J. Sodek. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000.* 1997;13:20-40
34. Y. Saito, T. Yoshizawa, F. Takizawa et al. A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 21):4191-200
35. F. Dolbeare, H. Gratzner, M. G. Pallavicini et al. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(18):5573-7
36. I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991;139(2):271-9.
37. S. Pullen, T. Dang, J. Crute, et al. CD40 Signaling through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factors (TRAFs). *J Biol Chem.* 1999;274(20):14246-54