

SYIA-01

人工再構成歯胚技術を用いたマウス歯肉接合上皮細胞株の樹立

関 辰明

キーワード：接合上皮、再構成歯胚、細胞株

【目的】歯周組織を構成する接合上皮 (JE) は、細菌の侵入に対し最前線で感染防御の役割を果たし、他の歯肉上皮と異なる構造、機能を有している。しかし、その性質には未だに不明瞭な部分があり、JEの有力な細胞株も存在していない。本研究では、マウス再構成歯胚技術を用いることでGFPを発現するJEを作製し、GFP陽性JE細胞の株化細胞の樹立を目的とした。

【方法】GFPトランスジェニックマウス歯胚由来の歯肉上皮と、野性型 (WT) マウス歯胚由来の間葉系細胞から再構成歯胚を作製し、WTマウスの上顎第一臼歯部に移植、再構成歯を萌出させた。再構成歯周囲のGFP陽性JE細胞をfluorescence-activated cell sorting (FACS)にて単離、回収し、RNAシーケンズを用いて遺伝子発現様式の網羅的解析を行った。また、レンチウイルスを用いてGFP陽性JE細胞にSV40 large Tを導入し、限界希釈法を用いて単一細胞由来の不活化GFP陽性JE細胞として、JE-1およびJE-2を作製した。作製したJE-1、JE-2の細胞増殖、老化、および遺伝子発現様式について解析を行った。

【結果と考察】再構成歯胚由来のGFP陽性JE細胞において、天然歯のJEで発現が報告されている *Odam*, *Krt17*, *Icam1* の発現が口蓋歯肉上皮細胞と比較して上昇していた。また、JE-1、JE-2は passage 40まで安定的に増殖し、老化マーカーである Senescence associated β -galactosidase の発現は認められず、JEと同様に *Krt* 群や *Icam1* の発現が認められた。以上の結果から、JE-1、JE-2は天然歯由来のJEと類似した遺伝子発現様式を示しており、JEの機能の一部を有している細胞株であることが示唆された。

SYIA-03

骨代謝制御におけるローヤルゼリーの効果とその分子メカニズムの解明

土谷 洋輔

キーワード：ローヤルゼリー、破骨細胞、FFAR4、shRNA

【目的】ローヤルゼリー (RJ) は栄養食品として古くから用いられており、抗炎症作用、抗菌作用等の様々な薬理的活性を持つことが知られている。骨に対する影響としては、骨形成を促進する可能性が報告されている一方で、RJの *in vivo*での効果とその詳細な分子メカニズムについては未だ不明な点が多く残されている。本研究では骨代謝制御におけるRJの効果を明らかにするとともにその分子メカニズムの解明を目的とする。

【材料と方法】9週齢のC57BL/6マウスに卵巣摘出 (OVX) を行った閉経後骨粗鬆症モデルを作製し、RJを4週間毎日経口投与したのち、 μ CTにて3次元骨構造を解析し、骨切片のトルイジンブルー・TRAP染色によって骨形態計測を行った。*in vitro*ではマウス骨髄マクロファージ系細胞へのRANKL刺激による破骨細胞分化培養を用い、破骨細胞分化に対するRJの影響を調べた。さらに、活性成分同定のためRJを分配クロマトグラフィー、逆相カラム、HPLC等により分離し、各段階で破骨細胞分化抑制活性を指標に精製し、最終産物をLC-MS/MSにて同定した。RJによる破骨細胞分化抑制に関わる分子メカニズム解明のため、qRT-PCR, reporter assay, ノックダウン実験により活性成分の受容体同定とその細胞内シグナル解析を行った。

【結果と考察】閉経後骨粗鬆症モデルマウスにRJを投与すると、破骨細胞数の低下によりOVXによる骨量減少が抑制された。実際に *in vitro*においてRJ濃度依存的に破骨細胞分化が抑制された。破骨細胞分化抑制活性を有する物質の実態解明のため、RJの分離、LC-MS/MSによる解析を行ったところ、脂肪酸である10-Hydroxy-2-decanoic acid (10H2DA) を同定することに成功した。さらに、破骨細胞に発現する10H2DA受容体としてFree fatty acid receptor 4 (FFAR4) を同定した。10H2DAがFFAR4に結合すると、その下流でNF- κ Bが抑制され、shRNAによるFfar4のノックダウンで10H2DAの破骨細胞分化抑制活性が観察されなくなることも確認された。

【結論】RJの成分である10H2DAがFFAR4を介して破骨細胞分化を抑制することで骨吸収抑制・骨量上昇を誘導し、骨粗鬆症等に対する治療効果を有する可能性が示唆された。

SYIA-02

ZFNを用いたヒト歯髄細胞におけるHLA選択的遺伝子改変とiPS細胞の樹立

小足 周平

キーワード：歯髄細胞、HLA、ZFN、iPS細胞

【目的】ヒト白血球抗原 (HLA) は自己と非自己を区別する役割を果たしている。HLA-A, B, DRB1がハプロタイプホモである場合、レシピエント側のHLAハプロタイプの少なくとも一方と合致した場合には、理論上免疫拒絶を回避できる。現在、HLA-A, B, DRB1の3つのローカスがホモ (HLAハプロタイプホモ) である歯髄細胞を収集しiPS細胞にすることで移植用細胞バンクの構築が進められている。しかし、HLAハプロタイプホモドナーを発見するには膨大な費用と時間を必要とする。そこで、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を用い、特定のHLAローカスに遺伝子変異を誘導することで、擬似的にHLAハプロタイプホモの細胞を作製し、iPS細胞の誘導を試みた。

【材料と方法】HLA-A*02ローカスを特異的に切断するよう設計したZFNを発現するプラスミドを歯髄細胞 (HLA-A*02:33B*44:DRB1*13-) に導入した。抗HLA-A*02-FITC抗体で細胞を蛍光標識したのち、FACSを用いてHLA-A*02陰性画分を分取し拡大培養を行った。DNAのHLA-A*02領域と、HLA-A*33領域をそれぞれPCRで増幅し遺伝子配列の解析を実施した。次に、ZFN処理群にセンダイウイルス (SeV) ベクター (Cytotune-iPS2.0) を用いて山中4因子を導入し、iPS細胞の誘導を行った。

【結果】FACSにより、ZFN処理群にてHLA-A*02分子の発現が低下した画分が得られた。この画分を分取し、遺伝子配列を解析した結果、HLA-A*02アレルに選択的な欠失やHLA-C, H領域との相同組み換え変異を認めた。一方でHLA-A*33アレルにはオフターゲット変異は確認されなかった。これらの実験結果より、ZFN処理群ではHLA-A*02領域に選択的な切断が起き、その結果様々な遺伝子変異が導入されていたことが示唆された。現在、SeVベクターを用いて誘導されたiPS細胞のHLA領域の遺伝子配列を解析中である。

【結論】ZFNはHLA-A*02領域を特異的に切断し、欠失や相同組み換え修復変異を誘導した。特定のHLA領域に選択的に変異を導入し、不活化する事が可能になれば、HLAハプロタイプホモドナーの発見にかかるコストを大幅に下げ、移植用細胞バンクの構築ができるようになるだろう。