

YIA-01

細胞内グルコース欠乏はオートファジーを誘導し歯肉組織の恒常性を維持する

李 潤伯

キーワード：歯肉線維芽細胞、グルコース代謝、オートファジー、創傷治癒、恒常性

【目的】グルコースは主要な細胞代謝のための重要なエネルギー源の一つである。ヒト歯肉線維芽細胞 (HGnFs) は解糖系経路を利用して機能を維持しており、歯肉組織の創傷治癒に携わっている。しかし、グルコースが欠乏する環境が末端歯肉組織の創傷治癒に与える影響を検討した報告は少ない。本研究では低グルコース環境がHGnFsの機能やストレスに及ぼす影響を検討し、HGnFsのグルコース代謝とオートファジーの関連に着目し、リン脂質結合反応系関連タンパクの解析を行った。

【材料及び方法】グルコース濃度100mg/dLを生理的濃度に設定し、低グルコース群として50, 25, 0mg/dLに調整し、HGnFsを培養した。創傷治癒能力の評価として細胞増殖、細胞遊走、I型コラーゲン合成能力を検討した。細胞ストレスはLactate dehydrogenase (LDH) 放出とROS産生について評価した。低グルコース環境におけるグルコース取り込み能力についてGLUT1 mRNA発現、グルコース吸収量を測定した。グルコース代謝の指標として、ATP合成量と乳酸産生量を測定し、細胞エネルギーセンサーAMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 経路に及ぼす影響を検討した。オートファゴソーム認識タンパクLC3Bとp62の発現の検討も行った。

【結果と考察】本研究では、72時間以内の低グルコース群でLKB1-AMPKシグナル伝達経路を介してGLUT1 mRNAの発現の増強が認められたことから、低グルコース環境では細胞内へのグルコースの取り込みを促進する可能性が示唆された。また、乳酸とATPは解糖過程の中間代謝産物と最終代謝産物であるが、グルコース50mg/dLの群では72時間後に乳酸とATPの産生量が100mg/dL群に比べ相対的に増加し、解糖活性を増強することで、細胞増殖、遊走、I型コラーゲン合成が促進されたことから、HGnFsの創傷治癒能力が活性化しと考えられる。一方、72時間以上の低グルコース環境が継続すると、LDHや活性酸素などの細胞ストレスを誘導することも明らかになり、これらの細胞ストレスはHGnFs創傷治癒能力を阻害すると考えられる。また、低グルコース環境により活性化されたLKB1-AMPKシグナル伝達経路はオートファジーを誘導し、LC3Bとp62の選択的分解により、ATPの合成を促進し、細胞の生存を図ることが明らかになった。

【結論】歯肉外科直後などの末端歯肉組織における低グルコース環境はHGnFsのオートファジーを誘導し、さらに細胞内におけるグルコース代謝経路を活性化し、創傷治癒の促進と歯肉組織の恒常性を維持することが示唆される。

YIA-03

歯肉幹細胞由来エクソソーム内包miR-1260bによる歯根膜細胞の小胞体ストレス応答制御を介した破骨細胞分化の抑制

林 千華子

キーワード：歯肉幹細胞、エクソソーム、miRNA、RANKL

【背景および目的】演者らはヒト歯肉幹細胞 (GMSCs) 由来エクソソームに内包されるmiR-1260bが、歯周炎治療のツールとなり得る可能性を見出した。Database解析で、新たにERストレス制御遺伝子のATF6βがmiR-1260bの最上位標的遺伝子であることを確認したことから、miR-1260bによるATF6βを介した歯周炎制御機構について検討した。

【材料及び方法】マウス歯周炎モデルにおいて、ERストレス関連遺伝子の発現状況を確認後、歯肉へのmiR-1260b投与によるATF6βの発現変動 (免疫蛍光染色) と骨吸収抑制効果の測定 (μCT解析) を行った。miR-1260bをラベリングし、局所投与後の経時局在を確認した。In vitroでは、ヒト初代歯根膜細胞 (PDLcs) を用いて、①miR-1260bによるERストレス関連遺伝子の発現変動 ②ATF6β-siRNAによる骨吸収関連遺伝子の発現変動、およびその上清を用いた単球系細胞 (PBMC, RAW-D) における破骨細胞分化への影響を確認した。

【結果及び考察】マウス歯周炎モデルの歯肉組織においてATF6βの発現が強く誘導されたが、miR-1260b局所投与によりATF6β発現が抑制され、骨吸収が抑制された。PDLcsではmiR-1260b導入により、ATF6βの発現が有意に抑制され、ATF6β-siRNAによってもRANKLの発現量が有意に減少した。ATF6βノックダウンPDLcs培養上清で破骨細胞の分化が抑制された。以上から、miR-1260bは歯根膜細胞における小胞体ストレス応答を介して破骨細胞の分化を抑制することが示唆された。

YIA-02

Wound healing in periodontal disease induces macrophage polarization characterized by different arginine-metabolizing enzymes

宮下 幸大

キーワード：arginine metabolism, macrophage, periodontal disease, wound healing

【背景と目的】マクロファージ (MΦ) は、炎症型MΦ (M1-MΦ) と抗炎症型MΦ (M2-MΦ) の2つの表現型があり、炎症の惹起から創傷治癒まで重要な役割を果たしている。また、アルギニンを基質とする2つの対照的な代謝酵素であるinducible nitric oxide synthase (iNOS) とarginase-1 (Arg-1) が、それぞれM1-MΦとM2-MΦのマーカーとして知られている。本研究の目的は、マウスの実験的歯周炎の進行期と治癒期におけるMΦ表現型の経時的動態を解明することである。

【材料及び方法】C57BL/6Jマウスを、対照 (C) 群、歯周炎 (P) 群、治癒 (H) 群の3群に分けた。歯周炎を誘発するために、P群とH群のマウスの上顎第二大臼歯に絹糸を結紮した。H群では、結紮から3日後に絹糸を除去し、歯周組織の治癒を誘導した。C群は0日目、P群は1, 3, 5, 7日目、H群は5, 7日目にそれぞれ上顎組織を採取した。上顎の左側は骨構造解析と遺伝子発現解析、右側ではHE染色と免疫染色を行い、歯周組織の状態や各表現型のMΦの局在を生化学的・病理組織学的に評価した。

【結果】HE染色像では、P群は付着の喪失や炎症性細胞浸潤の増加などを認め、一方、H群はそれらの改善を認めた。骨構造解析では、P群で歯槽骨吸収量が有意に増加し、骨密度は経時的に減少したが、H群では改善した。また、P群ではiNOSなどの遺伝子発現が増加し、一方で治癒群ではArg-1などの遺伝子発現が増加した。さらに、iNOS/Arg-1発現比は結紮糸留置により経時的に増加したが、H群ではP群に比べて有意に減少した。免疫染色では、iNOS⁺MΦ数がP群で有意に増加し、H群では減少したが、対照的に、Arg-1⁺MΦ数はP群で減少し、H群で増加した。

【結論】歯周病の創傷治癒は、iNOSとArg-1により特徴づけられるM1-MΦからM2-MΦへの極性転換と関連することが示唆された。iNOSとArg-1が歯周組織の炎症および治癒の状態を反映するマーカーであることから歯周病を評価する新たな指標となる可能性が示された。