

## 分担研究報告書

### AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制がヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化およびセメント芽細胞様分化に及ぼす影響について

研究分担者 前田 英史 九州大学歯科保存学研究分野 教授  
研究協力者 杉井 英樹 九州大学歯科保存学研究分野 助教

**研究要旨** AhR シグナルの活性化による Tenascin-C の発現抑制はヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化およびセメント芽細胞様分化を抑制する。

#### A. 研究目的

歯周組織は歯を支持する上で重要な組織であるが、油症患者では、歯周組織の破壊によって生じる歯周ポケットが深化する可能性があることが報告されている。したがって、油症患者の歯を長期にわたり維持するためには、歯槽骨、セメント質および歯根膜を含む歯周組織の破壊機構を明らかにし、破壊された歯周組織を再生することが重要であると考えられる。組織再生において幹細胞は重要な役割を担っており、歯根膜細胞に含まれる歯根膜幹細胞は、骨芽細胞またはセメント芽細胞への分化能を有し、歯周組織再生に寄与すると言われている。芳香族炭化水素受容体 (AhR) はダイオキシンの受容体で、その活性化により活性酸素を産生することで、油症の症状惹起に関与するとされている。私たちはこれまでに、AhR に結合することが知られるベンゾピレン (BaP) によって AhR シグナルを活性化したヒト歯根膜細胞 (BaP-HPDLC) と、活性化していないヒト歯根膜細胞 (Cont-HPDLC) を用いて、マイクロアレイ解析を行った。その結果、BaP-HPDLC において Tenascin-C (TNC) の発現が抑制された。さらに、TNC を発現抑制したヒト歯根膜細胞 (HPDLC) において、そのコラーゲン形成能が優位に低下することが明らかとなった。しかしながら、TNC が HPDLC の分化能に及ぼす影響は明らか

にされていない。そこで本研究では、AhR シグナルの活性化による TNC の発現抑制が、HPDLC の骨芽細胞様分化およびセメント芽細胞様分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

HPDLC において、TNC の遺伝子発現を siRNA 試薬によって抑制し、その石灰化能に及ぼす影響を、Alizarin red S 染色法を用いて解析した。さらに、骨関連因子である *Bone sialoprotein (BSP)*, *Osteocalcin (OCN)*, *Osteopontin (OPN)* および *Osterix (OSX)* の遺伝子発現、およびセメント質関連因子である *Cementum attachment protein (CAP)* および *Cementum protein 1 (CEMP1)* の遺伝子発現に及ぼす影響を、定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

HPDLC の使用は、九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会へ申請を行ったのち、承認を得ている。またインフォームドコンセントを行い、患者からの同意を得たうえで実験に使用している。細胞には匿名加工化を行い、本人特定を不可としている。

#### C. 研究結果

siRNA 試薬を用いて、HPDLC における TNC

の遺伝子発現を抑制したところ、骨芽細胞様分化に特徴的な石灰化（図1）、および*BSP*, *OCN*, *OPN*および*OSX*の遺伝子発現（図2）が、TNCが発現抑制されていないHPDLCと比較して有意に低下した。次に、セメント質関連因子である*CAP*および*CEMP1*の遺伝子発現は、TNCの遺伝子発現を抑制したHPDLCにおいて、TNCの遺伝子発現が抑制されていないHPDLCと比較して、有意にその発現が低下した（図3）。

#### D. 考察

TNCは細胞外マトリックスの糖タンパクの一つであり、骨芽細胞の分化中にその発現が上昇することが報告されている（Morgan et al., *J Cell Biochem*, 2012）。本研究では、TNCを発現抑制したHPDLCにおいて、その骨芽細胞様分化およびセメント芽細胞様分化が抑制されたことより、AhRシグナルの活性化によるTNCの発現抑制により、歯根膜細胞の骨芽細胞様分化およびセメント芽細胞様分化が抑制されることで、歯周組織の破壊に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

#### E. 結論

AhRシグナルの活性化によるTNCの発現抑制はヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化およびセメント芽細胞様分化を抑制する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当無し。

##### 2. 学会発表

該当無し。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

該当無し。

#### 2. 実用新案登録

該当無し。

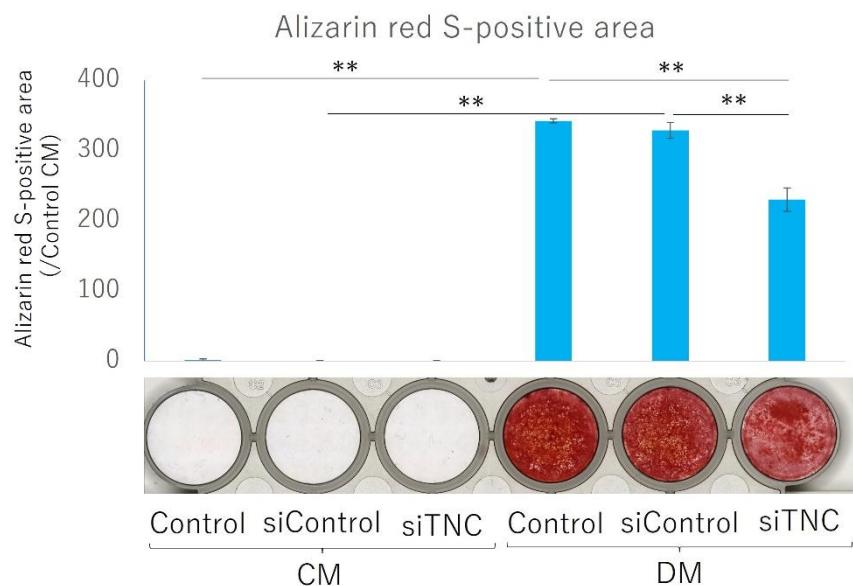


図 1. TNC の発現抑制が HPDLC の石灰化に及ぼす影響  
 siRNA 試薬にて TNC を発現抑制した HPDLC (siTNC) は、 $\alpha$ MEM/10%FBS (CM) または 1.5 mM の  $\text{CaCl}_2$  を含有した CM (DM) にて、2 週間培養された。siControl を導入した HPDLC (siControl) および非導入の HPDLC (Control) を対照群として用いた。培養後、Alizarin red S 染色を行い、Alizarin red S 陽性領域の定量化を行った。n=3, \*\*  $p < 0.01$ 。

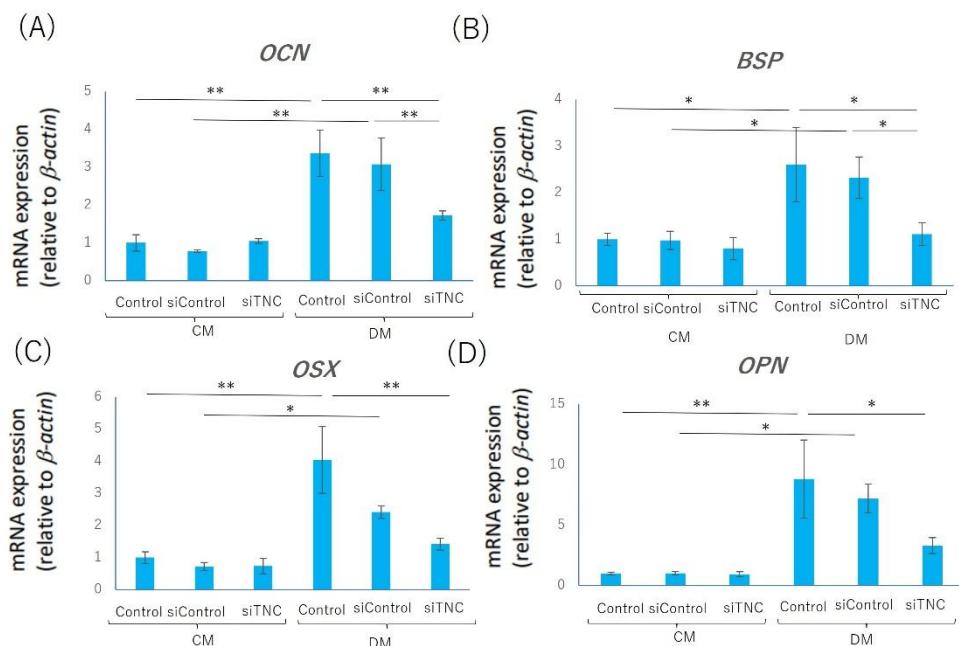


図 2. TNC の発現抑制が HPDLC の骨関連因子の遺伝子発現に及ぼす影響  
 siRNA 試薬にて TNC を発現抑制した HPDLC (siTNC) は、 $\alpha$ MEM/10%FBS (CM) または 1.5 mM の  $\text{CaCl}_2$  を含有した CM (DM) にて、2 週間培養された。siControl を導入した HPDLC (siControl) および非導入の HPDLC (Control) を対照群として用いた。培養後、定

量的 RT-PCR 法を用いて、骨関連因子である *Bone sialoprotein (BSP)*, *Osteocalcin (OCN)*, *Osteopontin (OPN)* および *Osterix (OSX)* の遺伝子発現を解析した。n=3, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01。

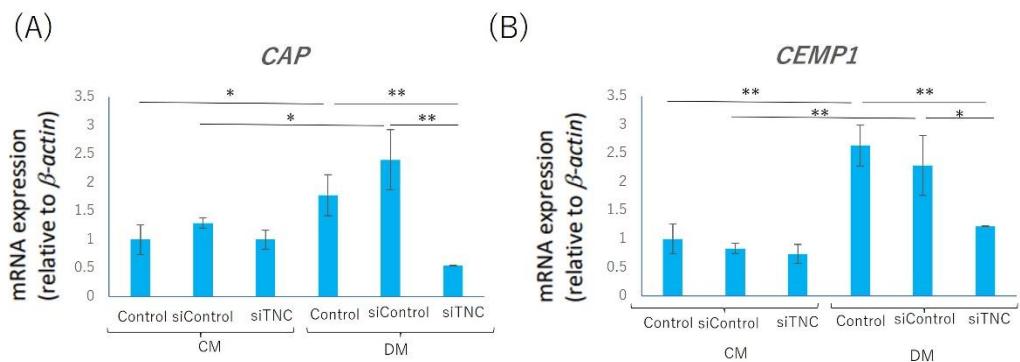


図3. TNC の発現抑制が HPDLC のセメント質関連因子の遺伝子発現に及ぼす影響  
siRNA 試薬にて TNC を発現抑制した HPDLC (siTNC) は、 $\alpha$ MEM/10%FBS (CM) または 1.5 mM の  $\text{CaCl}_2$  を含有した CM (DM) にて、2 週間培養された。siControl を導入した HPDLC (siControl) および非導入の HPDLC (Control) を対照群として用いた。培養後、定量的 RT-PCR 法を用いて、セメント質関連因子である *Cementum attachment protein (CAP)* および *Cementum protein 1 (CEMP1)* の遺伝子発現を解析した。n=3, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01。