

O-1

細胞シート工学を用いた口腔軟組織の再生
 ○山根 茂樹^{1,2}、梅澤 貴志¹、比嘉 一成^{2,3}、島崎 潤^{2,3}、井出 吉信¹、阿部 伸一^{1,2} (1東歯大歯解剖、2東歯大 口科研、3東歯大 市川病院眼科)

【目的】頬粘膜痛などによって広範な粘膜摘出後に、自己細胞による口腔粘膜細胞シートの応用が試みられているが、直下の筋層の再構築までは困難なことから治癒後の咀嚼・嚥下機能障害という問題点が指摘されている。そこで、上皮、結合組織、筋肉の細胞シートをハイブリットさせた3層積層シートを開発し、生体におけるこれらの3層構造を *in vitro* で再現し、これらの構造維持に重要な細胞骨格、接着タンパクの局在を比較、検討した。【方法】上皮シート作製のため、日本家兎口腔粘膜から細胞を採取した。同時に酵素処理により分離した結合組織由来の細胞をゲル状のコラーゲンと混和し、インサート上に播種した。この結合組織ゲルを feeder 細胞とし、上皮細胞と共培養を行った。筋シートは日本家兎の筋芽細胞を用いて作製した。両シートを積層し、通常に従い凍結切片を作製し、細胞骨格タンパク、接着タンパクの局在観察のため、免疫組織化学的染色を行った。【結果】上皮シートが結合組織ゲルを介して、筋肉シートと密接な状態であることがわかった。また、それぞれのシートに生体と同様な中間径フィラメントの発現が確認された。上皮基底層、結合組織にコラーゲンや接着関連タンパクも観察されたことから、良好な積層シートが作製可能となった。

O-2

糖尿病モデルラットにおける神経移植後の下顎切歯歯根膜神経線維の再生
 ○浜田 尚香¹、本間 志保¹、脇坂 聡¹ (1阪大歯 口腔分化発育情報)

【目的】我々は先の大会でI型糖尿病モデルラット(DMラット)における下顎切歯歯根膜神経線維の分布と下歯槽神経切断後の再生について報告した。今回、DMラットと正常ラット(CTLラット)間での神経移植後の下顎切歯歯根膜ルフィニ神経終末の再生を検索した。【方法】6週齢の雄性SD系ラットを24時間絶食後にストレプトゾトシン(STZ)を65mg/kg腹腔内投与したものをDMラット、生理食塩水を腹腔内投与したものをCTLラットとし、投与2週後にこれらの動物間で顔面神経頰枝を下歯槽神経切断部に移植し、8週後に下顎骨を採取した。protein gene product 9.5 (PGP9.5)、S-100をマーカーとして用い、下顎切歯歯根膜神経の再生を免疫組織学的に比較検討した。【結果と考察】レシピエントがCTLの場合、ドナーがCTLとDMどちらであってもPGP9.5陽性線維、S-100陽性細胞共にはほぼ正常の分布を示した。それに対し、レシピエントがDMの場合、ドナーの状態に関係なくPGP9.5陽性線維の再生に遅れが認められ、S-100陽性細胞の数は減少していた。以上のことより、神経再生には損傷神経の状況よりも、再生の場が重要であることが推察される。

O-3

マウス歯胚他家移植実験を用いた歯髓構成細胞集団の生後変化の解明
 ○大島 勇人¹、中木 哲朗¹、斎藤 浩太郎¹、中川 英蔵¹、依田 浩子¹ (1新大院医歯 硬組織形態)

【目的】萌出歯と未萌出歯では歯髓細胞の骨・象牙質形成能に差があることが報告されている。本研究は、マウスを用いた歯胚移植動物実験モデルを確立し、この実験モデルと胎生期BrdUラベリング法とGFPマウスを組み合わせることで、生後の歯の発生過程における歯髓細胞集団の変化を検索することを目的とする。【方法】胎生期E15~17に母獣の腹腔内にBrdUを投与して、非対称分裂をする幹細胞/前駆細胞をラベルし(ラベル細胞)、深麻酔下で生後1~2日齢のラベルB6マウス下顎第一臼歯の歯胚を、歯根形成期の生後2週齢の非ラベルB6マウス上顎第一臼歯部抜歯窩へと移植し、3日~3週間後にアルデヒド系固定液で灌流固定し、 μ CT解析、EDTA脱灰後、パラフィン切片を作製し、抗ネスチン、抗BrdU、抗Ki67抗体を用いた免疫染色、Tunel染色を施し顕微鏡で観察した。さらに、GFPトランスジェニックマウスをドナーまたはホストとして歯胚移植実験を行った。【結果および考察】移植歯胚は術後2週には萌出を完了し、正常な数の咬頭が形成され、歯根形成も正常に進行した。ラベル細胞は歯髓中央部血管周囲に維持されており、ネスチン陽性象牙芽細胞にコミットされていた。ドナー細胞は象牙芽細胞を含む歯髓細胞や血管細胞に維持されていたが、ホスト細胞が術後に歯髓内に増加することが明らかになった。以上より、歯髓構成細胞集団が生後に変化し、その分化能に影響を与えることが示唆された。

O-4

エナメル上皮腫におけるThymosin β 4の発現とその役割について
 ○清島 保¹、永田 健吾¹、和田 裕子¹、藤原 弘明¹、坂井 英隆¹ (1九大 歯 口腔病理)

【目的】歯原性腫瘍で最も発生頻度が高いエナメル上皮腫は良性腫瘍であるが、局所侵襲性/骨破壊性に発育する。我々は、歯胚発育過程のThymosin β 4 (T β 4)の関与を報告してきた。また、T β 4は悪性腫瘍の発育・浸潤にも関わるという。今回、我々はエナメル上皮腫におけるT β 4の発現を歯牙腫他と比較し、その役割について検討した。【方法】エナメル上皮腫40症例、歯牙腫11症例、エナメル上皮線維歯牙腫2症例、他1症例の計54症例の組織標本に免疫染色を施し、T β 4の発現様式を比較検討した。また、エナメル質成分のameloblastin, amelogeninおよびenamelinに対する免疫染色も行った。【結果】T β 4陽性像は、エナメル上皮腫の胞巣周辺円柱状細胞およびその内側の星状~多角形の細胞において認められた。エナメル上皮線維歯牙腫では上皮胞巣内に同様の陽性像を認めた。また、歯牙腫内や歯肉に発生したエナメル器様構造物にも同様の陽性像を認めた。これらのT β 4陽性領域においてameloblastin, amelogeninおよびenamelinの陽性像は確認されなかった。一方、歯牙腫では、基質形成のない部分のエナメル芽細胞の一部T β 4陽性を認めたが、エナメル基質を生成した部分ではT β 4陽性像は認められなかった。ameloblastin, amelogeninおよびenamelinの陽性像はエナメル基質とそれに近接する円柱状細胞に観察された。【考察】T β 4がエナメル上皮腫の細胞分化や形質に関与することが示唆された。

O-5

歯髄炎における MMP-3 の抗炎症、組織再生作用の検討

○中村 博幸¹、中島 美砂子¹ (1国立長寿医療研究セ 再生歯科医療)

歯科の臨床において虫歯(虫歯)が歯髄の一部にでも及ぶ(一部性歯髄炎)と炎症と壊死が徐々に全体に広がる。現在これを阻止する方法がないため、他の部位の歯髄が正常であっても全部除去する以外に治療法はない。さらに、歯髄組織は歯牙象牙質の代謝に関わりその機能を維持する働きをもつため、歯髄組織の除去後は歯牙が劣化し抜歯の危険性が高まる。超高齢社会において歯牙の延命化は全身の健康状態維持に重要である。以前私達は、ラット歯髄内に存在する歯髄幹細胞が細胞外マトリックス分解酵素の MMP-3 を高発現していることを見出し、ラット非感染性歯髄創傷モデルで MMP-3 が組織の治癒を促進することを報告した。本研究では、イヌを用いて炎症の程度が異なる一部性歯髄炎モデルを作製し、MMP-3 を作用させた。その結果、術後 14 日において歯髄組織は壊死することなく組織再生が誘導されていた。また、MMP-3 処理により術後 3 日からマクロファージと抗原提示細胞の浸潤が抑制されていた。さらに、歯髄組織中の炎症性サイトカイン IL-6 および TNF-alpha 濃度を ELISA で測定した結果、IL-6 の発現が減少していた。一方で TNF-alpha の発現には変化はみられなかった。これらの結果から、MMP-3 が新しい歯髄炎および歯髄再生治療薬として有効である可能性が示唆された。

O-7

Effectiveness of antimicrobials in the pulpal healing process following intentionally delayed tooth replantation

○ Quispe-Salcedo Angela¹、依田 浩子¹、大島 勇人¹ (1新大 院医歯 硬組織形態)

Introduction: A mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline (3Mix) has been reported to be effective against oral bacteria from carious and endodontic lesions *in vitro* and *in vivo*. This study aimed to elucidate the effect of 3Mix solution on the pulpal healing of replanted teeth after intentionally delayed replantation.

Materials and methods: The upper right first molars of 3-weeks-old ICR mice were extracted and immersed in 3Mix solution at different concentrations from 5 to 60 minutes, in addition to PBS alone (control). Immunohistochemistry for nestin and Ki-67, TUNEL staining, and PCR analysis were performed to assess the pulpal healing from 0 to 14 days after operation.

Results: One week after replantation, nestin-positive immunoreactions verified tertiary dentin formation in the 3Mix group, whereas no tertiary dentin formation was observed at 2 weeks in the control. Moreover, the number of Ki-67 and TUNEL positive cells sharply decreased in the experimental groups, demonstrating that the pulpal healing has progressed.

Conclusions: The application of 3Mix in the intentionally delayed tooth replantation leads to accelerate the dental pulp regeneration in mice.

O-6

マウス歯髄におけるプロテオグリカン局在の検討
○雪田 聡¹、細矢 明宏¹、中村 浩彰¹ (1松歯大解剖 2)

【目的】 歯髄組織は領域によって異なるヘテロな細胞集団により構成されている。我々はプロテオグリカンが歯髄の性状を規定する細胞外環境要因の1つとして機能しているのではないかと考え、グリコサミノグリカン(GAG)鎖およびコアタンパクの局在を検討した。**【方法】** 4週齢マウスから下顎を採取し、免疫化学的染色によりプロテオグリカン、Erk1/2 および GDNF の局在を観察した。さらに、切歯から歯髄細胞を採取し、FGF2 添加、無添加に分けて培養した後 real-time PCR 法により遺伝子発現を検討した。**【結果】** コンドロイチン硫酸およびパーシカンの局在を示す免疫反応は下顎臼歯の歯髄中心部に強く認められる一方、ヘパラン硫酸(HS)およびパルカンの局在は咬頭部の象牙芽細胞下層に強く観察された。FGF シグナルに関与する Erk1/2 の局在は HS と類似しており、歯髄細胞に FGF2 を添加して培養すると神経栄養因子である GDNF の発現が有意に上昇する。さらに、歯髄における GDNF の局在は歯髄において、HS、パルカンおよび Erk1/2 と同様の局在パターンを示した。**【考察】** GAG 鎖およびコアタンパクの局在が歯髄の性状を規定する要素の1つであると示唆された。HS は FGF などの成長因子を保持する作用を有していることから、象牙芽細胞下層の HS は FGF シグナルの活性化を介した神経の維持環境を作り出している可能性が考えられた。

O-8

分化直後の象牙芽細胞に局在する SUMO 化修飾因子と Osterix

○細矢 明宏¹、雪田 聡¹、二宮 禎²、平賀 徹¹、吉羽 邦彦³、吉羽 永子³、中村 浩彰¹ (1松歯大解剖 2、2松歯大 総歯研、3新大 院医歯 う蝕)

【目的】 Small ubiquitin related modifier (SUMO) 化修飾は、ユビキチン化に類似したタンパク質翻訳後修飾であり、多くの転写因子に対して転写を調節することが報告されている。本研究では、SUMO 化修飾因子の象牙芽細胞分化における機能を検討する目的で、歯の発生ならびに象牙質再生過程における SUMO 化修飾因子と Osterix の関連を検討した。**【方法】** Lewis 系ラット下顎第一臼歯の発生過程ならびに窩洞形成後の SUMO-1、SUMO-2/3、Ubc9 及び Osterix の免疫局在を観察した。また、免疫沈降法にて SUMO-1 と Osterix の結合を検討した。**【結果と考察】** 臼歯発生過程において、分化直後の象牙芽細胞で SUMO 化修飾因子および Osterix の陽性反応が認められたが、成熟象牙芽細胞、前象牙芽細胞ならびに歯髄細胞は陰性であった。窩洞形成後の象牙質再生過程における局在は、4 日後の窩洞直下歯髄組織に集積する細胞で SUMO 化修飾因子および Osterix の陽性反応が認められた。7 日後、修復象牙質形成が始まると、再生象牙芽細胞で各分子の陽性反応が認められた。また免疫沈降法にて、Osterix は SUMO-1 タンパクと結合し、SUMO 化修飾を受けることが示された。以上の結果より、SUMO 化修飾因子は分化直後の象牙芽細胞において Osterix の転写を調節し、象牙芽細胞分化に重要な役割を担うことが示唆された。

O-9

象牙芽細胞における TRPM8 チャンネルと TRPA1 チャンネルの発現検索

○津村 麻記^{1,2}、Sobhan Ubaidus¹、佐藤 正樹¹、西山 明宏³、田崎 雅和²、澁川 義幸^{1,2} (1東歯大 口科研 hrc8、²東歯大 生理、³東歯大 オーラル)

冷感受性チャンネルである TRPM8 (transient receptor potential melastatin subfamily member 8) チャンネルと冷感受性・侵害受容チャンネルである TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1) チャンネルの象牙芽細胞における発現を検索した。新生仔ラット切歯から得た歯髄スライス標本上で象牙芽細胞を同定し、fura-2を用いて細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) を計測した。免疫化学染色、免疫蛍光染色において象牙芽細胞突起と象牙芽細胞膜遠心部に TRPM8 チャンネル、TRPA1 チャンネルの発現が見られた。細胞外 Ca²⁺存在下で TRPM8 チャンネルアゴニストのメントール、イシリン、WS3、WS12 を投与すると [Ca²⁺]_i が増加した。イシリン、WS3、WS12 による [Ca²⁺]_i の増加は TRPM8 チャンネルアゴニストのカプサゼピンまたは選択的な TRPM8 チャンネルアゴニストの 5-benzyloxytryptamine で抑制された。細胞外 Ca²⁺非存在下で WS3 を投与した時は [Ca²⁺]_i に変化はみられなかった。細胞外 Ca²⁺存在下で TRPA1 チャンネルアゴニストのイソチオシアニル酸アシル (AITC) を投与すると [Ca²⁺]_i は増加し、その増加は TRPA1 チャンネルアゴニストである HC030031 で抑制された。加えて WS3 と AITC の反復投与を行ったところ、WS3 と AITC による [Ca²⁺]_i の増加は脱感作した。象牙芽細胞に TRPM8 チャンネルと TRPA1 チャンネルが発現しており、象牙芽細胞は TRPM8 チャンネル、TRPA1 チャンネルにより冷涼・冷(痛)刺激を受容することが示唆された。

O-11

ヒトの永久歯における歯髄結石の組織構造と元素組成について

○高橋 正志¹、後藤 真一² (1日歯大 新潟短大、²日歯大 新潟生命歯 理工)

【目的】ヒトの永久歯における歯髄結石の組織構造と元素組成の原生象牙質との違いについて検討した。【材料と方法】抜去後、ただちに 10% 中性ホルマリンで固定したヒトの永久歯の軟 X 線写真を撮影し、明瞭な歯髄結石の認められた標本を使用した。歯髄結石の縦断研磨標本を作製し、偏光顕微鏡と位相差顕微鏡で観察した。同一標本の研磨面を、0.05 N HCl で 3 分間腐蝕し、定法により白金蒸着を施し、S-800 型走査電顕 (日立) で組織構造を観察した。無処理の歯髄結石および同一歯の髄周象牙質の元素の重量比率を、JXA-8900 型 EPMA (日本電子) で定量分析した。【結果】歯髄結石の縦断研磨標本を偏光顕微鏡で観察すると、薄い透明層と厚い不透明層が交互に並ぶ同心円状構造がみられた。象牙細管構造物は、厚い不透明層では歯髄結石の中央部から表面に向かって連続的に走向し、薄い透明層では走向が不連続的であった。歯髄結石の形成面は、固形の形成面と線維状の形成面に大別された。Ca・P の含有率は、原生象牙質よりも歯髄結石で高く、O・Na の含有率は、逆の傾向を示した。【考察】歯髄結石は不連続的に、形成期と形成休止期を交互に繰り返して形成されると考えられる。線維状の形成面は形成期の、固形の形成面は形成休止期の歯髄結石の形成面の形態を示すと推察される。【結論】ヒトの永久歯の歯髄結石と原生象牙質の間には、組織構造と元素組成において違いが認められた。

O-10

マウス歯胚形成を制御する Thymosin β10 の発現様式解析と機能解析

○塩塚 真帆^{1,2}、和田 裕子¹、清島 保¹、永田 健吾¹、藤原 弘明¹、高橋 一郎² (1九大 歯 口腔病理、²九大 歯 歯科矯正)

【目的】我々はこれまでに Thymosin β10 (Tβ10) のマウス胎生期歯胚における発現様式について経時的に検索し、本分子が歯原性間葉組織に特異的に発現していることを明らかにした。Tβ10 は神経系の発生やアポトーシス制御等に関わる多機能分子である。本研究では、マウス歯根形成期歯胚における Tβ10 の発現局在を経時的に検索し、高相同性を有する Tβ4 の発現局在と比較検討した。また、歯胚形成期における Tβ10 の機能的役割について検索した。【材料・方法】生後 14 日までのマウス下顎第一臼歯における Tβ10 と Tβ4 の発現局在を in situ hybridization 法を用いて検索した。次に、器官培養法を用いて、Tβ10 機能阻害による影響を組織学的に評価した。また、Ki-67 免疫染色と TUNEL 蛍光染色を行った。更に、マウス歯髄細胞を用いて Tβ10 機能阻害実験を行い、歯原性因子発現量の変化を検索した。【結果・考察】マウス歯根形成期歯胚において、Tβ10 は象牙芽細胞の前駆細胞やヘルトヴィッヒ上皮鞘に特異的に発現していた。一方、Tβ4 は発現が認められなかった。また、器官培養において、Tβ10 発現抑制下では E11.0 歯胚は成長が抑制された。同様に E15.0 歯胚では歯乳頭組織の発育が抑制された。更に、Tβ10 機能阻害下での細胞培養では、歯原性因子の発現量に変化が認められた。これらの結果より、Tβ10 は歯胚形成過程において歯原性間葉由来の組織の形態形成や分化に関与していることが示唆された。

O-12

Mmp20、Klk4 及び Mmp20/Klk4 遺伝子欠損マウス中のエナメルタンパク質とプロテアーゼについて

○山越 康雄¹、大井田 新一郎¹ (1鶴見大 歯 分子生)

エナメリシン (MMP20) 及びカリクレイン 4 (KLK4) はエナメルタンパク質のプロセッシング及び分解に関わるプロテアーゼである。【目的】今回我々は、(1) Mmp20 及び Klk4 遺伝子欠損マウス中に残存するエナメルタンパク質とプロテアーゼを分析すること、(2) KLK4 の発現が MMP20 に起因するかを調べることを試みた。【方法】生後 5 日齢、11 日齢、15 日齢の野生型、Mmp20 遺伝子欠損 (*Mmp20*^{-/-})、Klk4 遺伝子欠損 (*Klk4*^{-/-}) 及び両遺伝子欠損 (*Mmp20*^{-/-}*Klk4*^{-/-}) マウスの第一大臼歯よりエナメルタンパク質を抽出し、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、ザイモグラフィを行った。また *Mmp20*^{-/-} マウスを利用して Klk4 プロモーター下流域に lacZ 遺伝子を導入した Klk4 遺伝子欠損マウス (*Mmp20*^{-/-}*Klk4*^{+/lacZ}、*Mmp20*^{-/-}*Klk4*^{lacZ/lacZ}) の各日齢における lacZ の発現を X-gal 染色にて調べた。【結果】プロテアーゼ遺伝子欠損マウスではエナメルタンパク質の残存が多く見られた。*Mmp20*^{-/-} マウスでは Klk4 活性が検出され、さらに 40kDa 付近には新規プロテアーゼの強い活性が検出された。また *Mmp20*^{-/-}*Klk4*^{+/lacZ}、*Mmp20*^{-/-}*Klk4*^{lacZ/lacZ} マウスにおいて lacZ の発現が検出された。【結論】MMP20 及び KLK4 のどちらかが欠損してもエナメルタンパク質は適切にプロセッシング及び分解されずにエナメル質に残存することが分かった。また KLK4 の発現には MMP20 が関与しないことも判明した。(米 国 ミシガン大学・Dr. Simmer 研究室との共同研究)

O-13

歯の損傷後の歯髄治療過程における BrdU ラベル細胞の維持機構について

○齋藤 浩太郎^{1,2}、大島 勇人¹ (新大 院医歯硬組織形態、²(独) 日本学術振興会)

【目的】 今回我々は胎生期ラベリング法を用いてマウスの歯の損傷後の歯髄治療過程における歯髄幹細胞あるいは前駆細胞と思われる Label-retaining cells (LRCs) の維持機構について解析した。

【方法】 妊娠 ICR マウスに 3 日間 BrdU を腹腔内投与し、生後 3 週齢マウス上顎第一臼歯を抜去後再植、あるいは歯根を切除し歯冠部を舌下部へ自家移植、またラベルマウスと非ラベルマウス間で他家移植した。術後 1 週から 8 週後に灌流固定し、ED-TA 脱灰後に抗ネスチン、抗 BrdU、抗 Ki-67 免疫組織化学および TUNEL 染色を光顕にて観察した。

【結果および考察】 再植・舌下部自家移植実験では、術後 1 週から持続的な第三象牙質の形成が認められ、術後 8 週では歯髄の狭窄が認められたものの、実験期間中を通して LRCs は歯髄中央部に維持されていた。また、LRCs のあるものは、新たに分化したと思われるネスチン陽性の象牙芽細胞様細胞にコミットされていた。一方、舌下部他家移植実験では、術後 2 週までは LRCs が歯髄中央部に維持されていたが、術後 4 週以降 LRCs は歯髄中央部から消失し、一部の髄角部に維持されているのみであった。以上より、歯の損傷後の歯髄治療過程において、他家移植と自家移植におけるドナー細胞とホスト細胞間の相互作用の相違が歯髄組織幹細胞あるいは前駆細胞の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

O-14

咬頭の下になぜ髄角があるのか？

○小澤 幸重¹、馬場 麻人²、寺島 達夫³ (日大、²東医歯大 院歯 硬組織構造生物、³東医歯大 院歯 顎顔面解剖)

背景 歯の形態において咬頭の直下に髄角がなぜ形成されるのか、なぜ歯冠のみに歯髄腔があるのか、歯根徴は歯の近心移動だけで説明しうるのかなどは、既知の事実として発生学的にも比較解剖学的に議論されることは殆ど無い。そもそも基本的な歯の形態形成要因の研究・議論は少ないことに不満を感じるのは私一人ではあるまい。例えば、遺伝子等の因子によって歯の浮彫像を語れるようになるには想像に余る年月を必要とするだろう。それ故にか、歯数、歯種、歯冠と歯根の意味は今もって不明であり明確な定義さえない。演者は前回、ニッシン提供の μ CT の三次元復元による歯冠、DEJ、歯髄形態相関の概略を報告し、エナメル質形成と顎の成長の関係などについて検討した。今回はこれをさらに進め、組織発生学および比較解剖学的側面にも分析を加え、大まかな歯の形態形成原則に至ったので議論したい。諸賢のご意見をいただければ幸甚である。

O-15

CT 画像を併用した歯科解剖学教育と社会貢献 (第 2 報)

○高橋 常男¹、熊坂 さつき²、森山 浩志³、小林 繁⁴ (神歯大 人体構造、²駒澤大 医療健康科学、³昭大 第 2 解剖、⁴九歯大 口腔解剖)

神奈川歯科大学は平成 24 年度 (後期) から実習に供する全解剖体について解剖実習棟内に設置した遺体専用 X 線 CT 装置で撮影された CT スライス画像、3 次元構築画像と実際の解剖と実際の解剖を適宜併用し、直視と 3 次元画像の複合情報によって人体構造をよりわかりやすく理解させるべくデジタル教育法を模索している。解剖体の撮影は基本的には固定前に行いスライス厚は研究用として 1 mm、診断用として 3 mm スライスとした。画像診断は放射線科医と連携して行ない歯科学的視点で全身解剖学教育に関係する項目を解剖前人体情報とした。固定前と固定後における画像変化が読影に及ぼす影響については還流固定の速度、固定液の事前脱気の関係も関係している可能性が大で、注入後では、血管内ガス所見で読影は困難であった。適正スライス厚の確定、固定前後の CT 画像の相違、死後変化など、読影精度の点では課題は依然と残っている。現在、頭頸部実習手技に従って 3 次元再構築画像教材を開発しているが、実習前に 3 次元動画像で、頭部輪郭、脂肪層の厚さの確認、顔面筋の推察と除去、咬筋・側頭筋の確認とそれらの除去、頬骨弓・筋突起の除去、顎動脈の確認また眼窩上壁、側壁の除去、その後に見える構造などについて、3 次元的に画像で理解 (デジタルダイセクション) し、実際のダイセクションを行う事で解剖学実習での予習、復習におけるデジタルダイセクション活用を提言したい。

O-16

教育ツールとしてのインプラント手術シミュレーターの開発-失敗事例の力覚データベースの構築-

○福田 真之¹、木下 英明¹、松永 智¹、井出 吉信¹、阿部 伸一¹ (東歯大 歯 解剖)

【目的】 歯科インプラント手術中の偶発症発生報告は数多く、そのほとんどが解剖学的構造の理解不足に起因すると考えられる。そこで、偶発症発生時を含め種々に想定されるケースにおいて、ドリリング時の力覚の擬似経験を可能とする、シミュレーター開発を行っている。本研究では、有限要素法 (FEM) を用いて反力データベースの構築を目的とした。**【方法】** 試料は、頭蓋骨の無歯下顎骨を用いマイクロ CT にて撮像後、解析ソフトを用いて有限要素モデルを作製した。その後、モデル化したドリルを骨梁との接触状態に留意して重ね合せ、反力の合算値を算出した。**【結果】** 以下の 3 ケースの失敗事例について述べる。すなわち、ドリリングの角度が不適切 (A)、ドリリング開始位置が不適切 (B)、ドリルの深度を誤って下顎管を損傷する (C) である。A では、抵抗が少ない海綿骨のドリリングから皮質骨に至る時に抵抗が大きくなる。B では海綿骨のドリリングでありながら常に抵抗が大きい。C では、ドリリング中に抵抗が徐々に少なくなったが、下顎管の管壁で抵抗が上昇する結果が得られた。**【考察】** FEM による解析結果は、骨梁の走行状態を反映した結果となっていることが確認された。また、FEM では失敗事例を多数想定することが可能である利点も確認できた。今後は献体数を増やし、種々の顎骨の状態やインプラント埋入位置・角度をパラメータとして、データベースを追加する予定である。

O-17

マクロファージ様細胞における GPR30 を介した Na, K-ATPase の活性化

○平沢 宏太¹、出山 義昭²、吉村 善隆²、鈴木 邦明² (¹北大 院歯 高齢者歯、²北大 院歯 細胞分子薬理)

Na, K-ATPase は細胞内外の Na⁺ならびに K⁺の濃度勾配の形成・維持を行っている。一方、エストロゲンはマクロファージによる炎症性サイトカインの産生を促進することが知られている。本研究はエストロゲンによるマクロファージの Na, K-ATPase に対する作用を明らかにすることを目的として行った。【材料・方法】マクロファージ様 Raw264.7 細胞に 17β-estradiol、さらに G-protein coupled receptor (GPR30) アゴニスト G1、あるいはアンタゴニスト G15 を 1 時間作用させて細胞を回収した。Na, K-ATPase 活性は Chifflet 法を用いて測定した。Na, K-ATPase タンパク質の発現ならびにリン酸化は western blot 法により分析した。【結果と考察】細胞に 17β-estradiol を作用させると 10⁻⁹ M をピークとした濃度依存的な Na, K-ATPase 活性の増加が認められた。さらに Na, K-ATPase タンパク質の発現ならびにチロシン残基のリン酸化も同様に増加した。G1 を用いた場合にも同様の結果であった。これらの増加は G15 を作用させることにより抑制された。これらの結果より 17β-estradiol は GPR30 を介して Na, K-ATPase タンパク質誘導とチロシンリン酸化により活性化させることが示唆された。

O-19

唾液腺の Ca²⁺ 応答と唾液分泌に対するムスカリン受容体パーシャルアゴニストとしてのピロカルピンの作用

○根津 顕弘¹、森田 貴雄¹、東城 庸介²、谷村 明彦¹ (¹北医大 歯 薬理、²北医大 歯 生物物理)

【目的】ムスカリン (M) 受容体の活性化は、細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇を起こして唾液分泌を促進する。唾液分泌促進薬として用いられるピロカルピン (Pilo) は M 受容体のパーシャルアゴニストであり、Pilo 刺激による腺房細胞の Ca²⁺応答はカルバコール (CCh) などの他の M 受容体アゴニストと比べ非常に小さい。今回我々は、Pilo の M 受容体アンタゴニストとしての作用および、唾液腺の Ca²⁺応答と唾液分泌との関係を調べたので報告する。【結果と考察】単離した耳下腺腺房細胞を Pilo で刺激すると [Ca²⁺]_i 上昇が観察された。Pilo は 100 μM でほぼ最大の [Ca²⁺]_i 上昇を起こしたが、この上昇は低濃度 (0.3 μM) の CCh よりも小さかった。CCh (10 μM) 刺激後に 100 μM Pilo を添加すると、CCh による [Ca²⁺]_i 上昇が 70% 以上抑制されたことから、Pilo が強いアンタゴニスト作用を持つことが明らかとなった。Pilo (3 mg/kg) による唾液分泌は、ヘキサメトニウム (20 mg/kg) では抑制されず、アトロピン (0.1 mg/kg) により抑制されたことから、Pilo による唾液分泌は M 受容体を介していることが確かめられた。以上の結果から、パーシャルアゴニストである Pilo は、唾液腺に小さな Ca²⁺応答しか起こさないが、これは唾液分泌の亢進に十分な応答であると考えられる。現在、Pilo による Ca²⁺応答と唾液分泌との関係を直接的に調べるため、唾液腺の Ca²⁺応答の *in vivo* イメージングによる解析を試みている。

O-18

PRIP は PI(4,5)P₂ 及び SNAREs との結合を介して開口分泌を調節する

○竹内 弘^{1,2}、杉山 悟郎¹、長野 公喜¹、大谷 崇仁¹、平田 雅人¹ (¹九大 院歯 口腔細胞工、²九歯大 口腔応用薬理)

我々が見出したタンパク質 PRIP の遺伝子欠損マウスではインスリンを始めとする複数のホルモンの分泌量増加を認めた。PRIP の欠損によって開口分泌が亢進していたことから、PRIP の存在は開口分泌に抑制的に作用すると考え、分子間相互作用に着目して開口分泌における PRIP の役割を検討した。精製した組換えタンパク質を用いたブルダウンアッセイとラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞からのノルアドレナリン (NA) 放出を指標として PRIP の各種変異体の分子間相互作用と開口分泌への影響を調べた。野生型 PRIP を発現させた PC12 細胞では高 K⁺ 刺激による NA 分泌が減少したが、プレクストリン相同 (PH) ドメインに変異を導入し膜リン脂質 PI(4,5)P₂ 結合能を失った PRIP 変異体は PC12 細胞の NA 分泌を抑制しなかった。また PRIP の C2 ドメインは膜融合過程の必須分子複合体 SNARE を構成する syntaxin 1 および SNAP-25 と直接結合したため、C2 ドメインを欠失した PRIP を PC12 に発現させたところ野生型 PRIP よりも開口分泌の抑制効果が減少した。これらの結果から PRIP は PH および C2 ドメインを介した PI(4,5)P₂ や SNARE 分子との直接的な結合を介して開口分泌が行われる所に局在し、抑制機能を発揮することが示唆された。

O-20

新規サイクリック AMP 活性化因子 Epac の咬筋肥大における役割

○大貫 芳樹¹、奥村 敏¹ (¹鶴見大 歯 生理)

【目的】β₂アドレナリン受容体(β₂-AR)の慢性刺激が骨格筋肥大を誘発することはこれまで数多くの報告があるが、その詳細なメカニズムの解析は不十分である。cAMPで活性化される因子として PKA が知られているが、PKA 以外に Epac(exchange protein activated by cAMP)と呼ばれる新規 cAMP 活性化因子が近年報告された。Epac は心筋肥大を誘発することが報告されているが、咬筋肥大における役割については不明である。本研究では、特異的 β₂-AR 作動薬クレムテロール (CB)の慢性投与で誘発される咬筋肥大における Epac の重要性を検討するため Epac1 遺伝子欠損マウス (Epac1KO) を作製し以下の実験を行った。【方法】Wild type (WT, n=12) と Epac1KO (KO, n=12) を、それぞれ対照群 (n=6) と CB 投与群 (2 mg/kg/day, n=6) に分け、計 4 群 (WT 群、WT+CB 群、KO 群、KO+CB 群) とした。CB 投与 3 週間後に咬筋(両側)を摘出し、筋重量を測定した。また、左側咬筋の筋線維を組織化学的手法で染色して筋線維直径を測定した。【結果】4 群間で投与前後の体重に有意差は見られなかった。また WT 群と KO 群の間で咬筋の重量および筋線維直径に有意な差はみられなかった。CB 投与により、WT では咬筋の重量および筋線維直径が有意に増加(筋重量で約 13%、筋線維直径で約 20% の増大)したのに対し、KO マウスでは有意な増加は観察されなかった。【結論】Epac1 は β₂-AR の慢性刺激による咬筋肥大に重要な役割を演じていることが示唆された。

O-21

ヒト唾液高プロリン短鎖ペプチドの生物活性の熱安定性評価

○齋藤 英一¹、谷口 正之²、加藤 哲男^{3,4} (1新潟工大院 環境、2新大院 自然、3東歯大 歯化、4東歯大 口腔科学研究セ hrc8)

【目的】我々はヒト唾液高プロリン短鎖ペプチドの「菌増殖阻害活性とグラム陰性菌内毒素 (LPS) の中和活性」を実用化するために、当該生物活性の熱安定性を評価した。【方法】ヒト高プロリンタンパク質 P-B の分解断片ペプチド PB-C1、PB-C2、PB-C3、PB-C4、PB-C2L をペプチド合成機で合成した。当該ペプチドのうち菌 (*S. mutans*)、口内炎菌 (*C. albicans*) および歯周病菌 (*P. gingivalis*) に対する増殖阻害活性の熱安定性を加速試験 (遮光下、40°C で 3 か月間) により評価した。次いで、*A. actinomycetemcomitans* Y4-LPS で刺激した正常ヒト大動脈血管内皮細胞による炎症性サイトカイン (IL-6) の誘導産生に対する阻害活性の熱安定性を加速試験 (遮光下、50°C で 30 日間) により検討した。【結果と考察】プロリンクラスターを内在しているペプチド (PB-C2、PB-C3、PB-C4、PB-C2L) は遮光下、40°C で 3 か月間保存 (25°C 保温、35.87 か月相当) しても、およそ 70% 以上の菌増殖阻害活性が残存していた。しかし、オリゴプロリン構造を持たない PB-C1 は 3 か月の保温で菌増殖阻害活性が 40% まで低下した。続いて、PB-C2L を 50°C で 3 日 (25°C 保温、1.71 か月相当)、10 日 (5.7 か月相当)、30 日 (17.1 か月相当) 保温した際の A.a.Y4-LPS 刺激による IL-6 誘導産生に対する阻害活性を解析したところ、それぞれ 81%、61%、0% の活性が残存していた。以上の試験成績は唾液高プロリン短鎖ペプチドの利用価値を高めるものと考えられる。

O-23

マウス唾液腺分化過程におけるグリコーゲン代謝の役割

○依田 浩子¹、中川 英歳¹、大島 勇人¹ (1新大院医歯 硬組織形態)

【目的】唾液腺分化過程におけるグリコーゲンおよびグリコーゲン代謝関連分子の局在を明らかにするとともに、細胞増殖、腺房および導管分化との関連性について *in vivo* 系ならびに *in vitro* 系にて検証した。

【方法】胎生期から出生後の ICR マウスを 4% PFA にて固定後、頭部組織のパラフィン連続切片を作製し、グリコーゲン、グルコース輸送体 (GLUT)、グリコーゲン合成・分解酵素、唾液腺細胞分化マーカー (アクアポリン-5、セラチン 14、セラチン 19)、Ki67 について免疫染色を行った。さらに、胎生 13 日齢マウス顎下腺組織の器官培養系にて、各種グルコース代謝関連分子の阻害実験を行った。

【結果と考察】胎生期マウス顎下腺の分化初期では、GLUT-2、GLUT-3 が細胞表面に発現し、活発な細胞増殖が生じていた。グリコーゲン陽性細胞はごく少数のみであった。一方、生後の分化が進んだ顎下腺組織では、グリコーゲン陽性細胞が増加し、腺房細胞ならびに導管上皮細胞で活発なグリコーゲン合成・分解が生じていた。さらに、グリコーゲン分解酵素阻害剤の存在下にて顎下腺組織を器官培養した結果、腺房および導管への分化が顕著に阻害された。以上より、唾液腺分化過程においてグリコーゲン代謝と細胞増殖、腺房および導管上皮細胞分化に密接な関連があることが示唆された。

O-22

外科的刺激に対する対照側顎下腺における Hsp27 の発現と変動

○溝部 健一^{1,2}、坂東 康彦¹、崎山 浩司¹、天野 修¹ (1明海大 歯形態機能成育 解剖、2明海大 歯機能保存回復オーラルリハビリ)

【目的】唾液腺は様々な損傷や外科処置に対して修復や再生が起こる。分子シャペロンである熱ショックタンパク質 (HSP) の一つの Hsp27 は、生理的な環境下、特に発生過程で強く発現し、ラット顎下腺では、腺房細胞の増殖分化の調節に関わると考えられている。今回、成獣ラットの右側顎下腺に種々の外科的侵襲を加え、手術側と正常な対照側における Hsp27 の局在と変動を組織化学的に解析した。【方法】免疫組織化学：生後 4 と 8 週齢のウィスター系ラットを用い、正常 (無処理) の顎下腺と、右側に以下の外科処置を行った顎下腺と、その対照側の顎下腺に対し抗 Hsp27 抗体を用いた免疫組織化学を行い、定面積内の陽性細胞数を統計学的に解析した。外科手術：1. 右側ワルトン管を動脈結紮用クリップで結紮し、1 週後にクリップを解除、2. 右側顎下腺の遠位側 1/2 を絹糸で結紮して切除、3. 右側顎下腺を全摘【結果および考察】Hsp27 は無処理の正常ラット顎下腺の介在部に局在し、種々の外科処置後の顎下腺において Hsp27 は手術側に発現するだけでなく、損傷を与えていない対照側にも強く発現が誘導された。Hsp27 陽性細胞数は術後急速に増加し、数週間後には無処置と同等に戻った。この変動は、代償性の肥大に関与すると考える。顎下腺介在部の Hsp27 は、腺房細胞への分化と関連して機能することが示唆された。

O-24

唾液腺における TRP チャネル発現と分泌メカニズム

○Sobhan Ubaidus¹、佐藤 正樹¹、四宮 敬史^{1,3}、大久保 みぎわ³、津村 麻記^{1,2}、田崎 雅和²、川口 充³ (1東歯大 口科研 hrc8、2東歯大 生理、3東歯大 薬理)

The function and the mechanism of transient receptor potential (TRP) channels in salivary secretion are essentially unknown. In order to define the role of TRP channels in secretory mechanism and/or the function of salivary glands, we examined the distribution and localization of temperature sensitive TRP channels in salivary glands. Real-time RT-PCR showed the mRNA expression of this TRPs channels and the immunohistochemistry showed the TRPs melastatin subfamily member-8 (TRPM8) which is activated at the temperature below 27°C and ankyrin subfamily member 1 (TRPA1) activated below 17°C expressed in myoepithelial cells (MECs), acinar cells (ACs) and ductal cells (DCs) of submandibular (SMG), sublingual (SLG) and parotid gland (PG) s. Where as the vanilloid subfamily member TRPV1, TRPV3 or TRPV4 which is activated over 41°C, between 22°-35°, over 37°C are also expressed in DCs, ACs and MECs in the SMG, SLG and PG. Significant difference of salivation rate was measured by infusion of different agonist of this thermo sensitive TRP channels.

O-25

TGF-beta 誘導性 EMT の分子機構
 ○齊藤 正夫¹ (山梨大 院医工 生化²)

EMT(上皮間葉転換)は上皮細胞が上皮細胞としての形質を失い、間葉系様細胞に形質変化する現象であり、初期発生や線維症、癌細胞の浸潤などに関与している。EMT を誘導する転写因子が高発現した癌細胞は浸潤・転移能が高く、また転移、再発した癌ではこれら EMT 誘導因子の発現が高い。したがって、EMT 誘導因子の発現を制御することにより癌の悪性度を低下させることが期待される。TGF-beta は EMT を誘導することが知られ、我々はこれまでに、その分子機構の解析を行ってきた。その結果、TGF-beta が ras などの癌遺伝子産物や FGF、EGF や TNF-alpha などの増殖因子やサイトカインと協調して EMT 誘導因子の転写を相乗的に上昇させ、さらにタンパク質安定性も調節している可能性も見出した。また EMT 誘導因子が選択的スプライシング制御因子の転写を調節して、多数の遺伝子のスプライシングバリエーションを上皮系から間葉系に変化させることも明らかとなった。したがって、EMT を司る分子やその分子機構が治療的な分子ターゲットのひとつとなる可能性を考え、現在 TGF-beta 誘導性 EMT の分子機構の解析を行っている。

O-27

口腔扁平上皮癌における腫瘍血管構築と M2 マクロファージ
 ○中右 かよ¹、田谷 雄二¹、島津 徳人¹、藤田 和也¹、佐藤 かおり¹、青葉 孝昭¹ (日歯大 生命歯 病理)

腫瘍微小環境に浸潤する Tumor-associated macrophages (TAM) は腫瘍の増殖・浸潤や血管新生に関与しており、TAM の機能として抗腫瘍性の M1 と向腫瘍性の M2 に分類されている。本研究では、CD163 発現を示す M2 マクロファージの役割を明らかにしていく目的で、外向性及び内向性増殖を示す口腔扁平上皮癌 (SCC) の微小環境における癌実質・新生血管・TAM の空間局在を可視化することにより三者の相互作用を検討した。腫瘍微小環境の形態解析に向けては、連続薄切標本に特異抗体を組み合わせた多重免疫標識を施し、癌胞巣 (サイトケラチン)、血管内皮 (CD31、CD34、CD105)、浸潤マクロファージ (CD68、CD163) を分画した。解析対象とした SCC 症例のいずれにおいても、腫瘍間質全域に分布する CD34 陽性血管内皮や CD68 陽性マクロファージとは対照的に、CD105 陽性の活性化血管内皮細胞と CD163 陽性マクロファージは癌胞巣周辺と胞巣内部に局在することが確かめられた。“Tumor-associated”の役割を形態学的に検証する上では、免疫表現型に基づく細胞分画とともに腫瘍空間における位置情報を捉えることが重要となる。今回の 3 次元観察では、癌細胞・血管内皮・M2 マクロファージの共存部位を検出することにより、腫瘍血管新生における TAM の“橋渡し機能”も示唆された。

O-26

血管周皮細胞欠失による上皮間葉移行と癌転移は Met シグナルにより制御される
 ○前田 元太^{1,2}、Cooke Vesselina G²、LeBleu Valerie S²、今井 一志¹、Kalluri Raghu² (日歯大 歯 生化、²ハーバード大 医 ベスイスラエルメディカルセンター マトリックスバイオロジー)

浸潤性乳癌における臨床研究では少数の血管周皮細胞が患者生存率に大きな影響を与える事が報告されている。しかし、血管周皮細胞がどのようにして癌転移に関連するかはよく分かっていない。そこで我々は血管周皮細胞に特異的な遺伝子 NG2 と PDGFRβ のコンディショナルノックアウトマウスを用い、周皮細胞が癌転移に及ぼす影響について調べた。これらのコンディショナルノックアウトマウスのプレストパットにマウス由来乳癌細胞を注射し、癌腫が 500 mm²になるのを待ち Ganciclovir を用い周皮細胞だけ死滅させ、原発巣と転移巣について精査した。その結果、コントロール群と比べ血管周皮細胞を欠失したマウスでは原発巣の成長が抑制されたが肺転移は増加した。そこで我々は、この肺転移増加のメカニズムを調べるため、分子生物学的手法を用い解析した。原発巣では血管周皮細胞が欠失することにより、血管成熟化が妨げられ低酸素状態になっていた。その低酸素状態の部位は Twist の上昇、E-cadherin の減少を含め EMT (上皮間葉移行) が生じた。この EMT がどのような Pathway を介して起きているかを調べるため、Met 阻害剤を用いて解析した。その結果、Met 阻害剤を用いる事により肺転移を減少させることができた。以上により、血管周皮細胞は原発巣における微小環境に影響を与え、癌転移における重要な因子であることが分かった。

O-28

ヒト口腔癌移植マウスモデルにおける脈管新生誘導
 ○白子 要一¹、添野 雄一¹、田谷 雄二¹、島津 徳人¹、藤田 和也¹、佐藤 かおり¹、青葉 孝昭¹ (日歯大 生命歯 病理)

生体機能を支える血管・リンパ管は周囲環境の変化に応じて動的に改築される。本研究では、マウス舌組織 (7-10 週齢 C57BL/6J マウスおよび BALB/c ノードマウス) を観察対象として、解剖学的な脈管構造と腫瘍環境下での脈管新生について 3 次元形態解析を行った。腫瘍環境の創出に向けては、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (高転移性株 3 種、低転移性株 2 種) をノードマウス舌側縁部へ移植した。癌細胞移植後 6~27 日において癌病変を含む舌組織を採取し、パラフィン包埋連続薄切標本 (4 μm 厚、50~100 枚) に PECAM (血管内皮細胞)、Lyve-1 (リンパ管内皮細胞)、サイトケラチン (癌細胞) による多重免疫染色を施した。健常な舌組織では、上皮結合組織および舌筋間隙に発達した微小血管網と上皮直下に位置する太いリンパ管が確認できた。腫瘍環境における脈管構造の改築に関しては、すべての癌細胞株に共通して移植後 6 日目において癌胞巣周囲に PECAM 陽性細胞と Lyve-1 陽性細胞が増加しており、3 次元観察では上皮直下のリンパ管が癌胞巣を取り囲む様に伸長してることが捉えられた。高転移性株では、癌胞巣の拡大にともない血管・リンパ管新生に関与する遺伝子発現が亢進しており、癌胞巣内部への微小脈管網の伸展も認められた。マウス舌組織へのヒト癌細胞株の移植モデルはリンパ管新生誘導とリンパ節転移機序の解明に適していると考えている。

O-29

三叉神経節における小胞型スクレオチドトランスポーター (VNUT) の発現について

○後藤 哲哉¹、郡司掛 香織²、片岡 真司¹、小林 繁¹ (1九歯大 頭頸部構造解析、2九歯大 顎口腔機能矯正)

【目的】口腔領域における侵害刺激によって、三叉神経節 (TG) 神経細胞は多様な神経ペプチドを産生し逆行性に分泌することにより、末梢の炎症や組織修復を調節している。TG の神経細胞は satellite glial cells (SGCs) で囲まれており、神経細胞の働きを助けているが、それらの相互作用はまだ明らかでない。本研究では神経細胞-SGCs 間の相互作用に ATP が関与しているかどうか確かめるために、vesicular nucleotide transporter (VNUT) の発現について、ラット臼歯を抜歯後の TG 神経細胞、SGCs について調べた。【方法】7 週齢ラット上顎臼歯を麻酔下で抜歯後、3、7、および 10 日後に固定し TG を取り出した。免疫組織化学としては、傷害を受けた神経細胞、活性化した SGCs のマーカーとしてそれぞれ抗 ATF3 抗体、抗 GFAP 抗体を用いた。また、VNUT の発現、局在に関しては、免疫組織化学、ISH、および RT-PCR により調べた。【結果と考察】抜歯後 TG 内の ATF3 陽性神経細胞周囲に GFAP 陽性 SGCs が見られた。TG における VNUT の発現は RT-PCR により確認されたが、ISH および免疫組織化学により神経細胞、SGCs のいずれにも発現が見られた。抜歯後、VNUT 陽性細胞数の増加は特に神経細胞で認められた。以上により、侵害刺激受容後の TG における神経細胞から SGCs に対する情報伝達に VNUT が関与していることが示唆された。

O-30

ラット三叉神経節ニューロンにおけるエンドセリン受容体を介した侵害受容機構

○山本 徹^{1,2}、小野 堅太郎¹、人見 涼露¹、椎葉 俊司²、稲永 清敏¹ (1九歯大 歯 生理、2九歯大 歯 歯科侵襲制御)

近年、炎症、外傷、癌の部位においてエンドセリン (ET) が高濃度に検出され、エンドセリンが疼痛発生に関与している可能性が示唆されている。三叉神経節ニューロンでは ET_A 受容体と ET_B 受容体が共発現しているという報告があるものの、その細胞機能についてはまだ明らかではない。本研究ではラット三叉神経節ニューロンにおける細胞膜への PKC ϵ 移行や細胞内カルシウム濃度変化についてエンドセリンの作用を調べた。単離三叉神経節ニューロンにおいて ET-1 刺激により、PKC ϵ 膜移行を示したニューロンが約 20% 増加した。この反応は ET_A アンタゴニスト BQ-123 で抑制されたが、ET_B アンタゴニスト BQ-788 では抑制されなかった。また ET-1 によりニューロンの約 20% で細胞内カルシウム濃度上昇が観察された。この反応は BQ-788 によって有意に減少したが BQ-123 による変化はなかった。以上の結果から、エンドセリンは、ET_A を介した PKC ϵ 移行と ET_B を介した細胞内カルシウム動員を個別に刺激することが示唆された。後根神経節神経支配領域では ET_B 受容体は侵害疼痛抑制に関与していると報告されているが、この三叉神経節ニューロンにおける ET_B 誘導カルシウム動員は口腔顔面領域の侵害受容機構に関与していると考えられた。

O-31

ヒト歯髄幹細胞由来無血清培養上清を応用した急性期脊髄損傷治療と治癒メカニズムの解析

○松原 弘記¹、山本 朗仁¹、酒井 陽¹、上田 実¹ (1名大 医 顎顔面外科)

脊髄損傷に有効な治療法はいまだない。受傷後 24 時間以内に急性期炎症性反応により多くの神経系細胞が失われ、一週間後 (亜急性期) 損傷部位に形成される「グリア瘢痕」由来の神経軸索伸長抑制因子群が神経軸索の再生・再編を難しくする。これまで我々は「ヒト歯髄幹細胞をラット脊髄損傷モデルに移植すると下肢運動機能が回復する」ことを報告してきた。近年、幹細胞由来のパラクライン因子による神経再生効果が注目されつつある中、歯髄幹細胞移植による脊髄再生も多くが幹細胞分泌因子によるものである可能性が高い。今回、我々は「ヒト歯髄幹細胞由来の無血清培養上清」を急性期ラット脊髄損傷モデルへ持続投与し、著明な下肢運動機能・歩行機能回復を認めた。骨髄間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞の培養上清を投与しても歩行機能は回復しなかった。詳細な解析で歯髄幹細胞の培養上清は、損傷部位へ集積した活性化ミクログリア/マクロファージを抗炎症系へと転化させ、脊髄損傷直後の組織破壊の環境を神経再生・修復環境に導くことを見いだした。さらに歯髄幹細胞の培養上清は、このミクログリア/マクロファージ修飾効果に加え、抗アポトーシス効果・抗神経軸索伸長抑制効果によって脊髄機能の再生を果たす。本研究結果によって、歯髄幹細胞培養上清の急性期脊髄損傷部位への局所投与は、細胞移植を必要としない安全かつ臨床的に応用しうる有用な治療手段となると考えられた。

O-32

脳虚血モデルにおける変性神経細胞のサイクリン G1 の局在と p53 非依存性核内移行について

○前田 光代¹、竹村 明道¹、上村 守¹、戸田 伊紀¹、諏訪 文彦¹ (1大歯大 解剖)

【目的】Cyclin G1 (CG1) は p53 の標的遺伝子で、舌下神経切除後の舌下神経核に CG1 が発現し上昇する。今回脳虚血時における神経細胞内の CG1 の動態について検索した。【方法】スナネズミ両側総頸動脈 5 分結紮後再開通、マウス中大脳動脈永久結紮の両モデルを作製した。術後 12 時間、1, 2, 3, 5, 7 日の脳を採取し、CG1、NeuN および MAP2 抗体を用いた免疫染色、In situ hybridization、TUNEL 染色、Fluoro-Jada B 染色、CG1 の免疫電顕を行った。さらに p53 ノックアウト (KO) マウスの永久結紮モデルを用い、術後 1、3、5 日の同上実験を行った。さらにマウス大脳皮質の primary culture を用い神経細胞への N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) の導入実験を実施した。【結果】海馬 CA1 の錐体細胞核に CG1 の mRNA、免疫陽性反応を認めた。p53KO マウスでも同様の CG1 の反応を認めた。NMDA 添加培養実験では、CG1 の神経細胞核内への移行を認めた。CG1 の核内移行が確認された神経細胞は死に至った。【考察】脳虚血時の神経細胞内 CG1 の核局在は p53 非依存であることが確認された。また、障害神経細胞の CG1 の細胞質から核内への移行は致死性損傷のよい指標となることが示唆された。

O-33

ヒスタミン H₃ヘテロ受容体はラット島皮質におけるシナプス伝達を抑制する
 ○小林 真之¹、武井 浩樹¹、越川 憲明¹ (1)大歯 薬理)

島皮質におけるシナプス伝達は、味覚嫌悪学習など神経可塑性を制御する重要な因子である。我々は neuromodulator によるシナプス電流の修飾機構に焦点を当てて研究を進めている。H₃受容体は自己受容体として知られ、島皮質に多く存在し味覚嫌悪学習の獲得を制御しているが、その制御メカニズムは不明である。そこで本研究は、H₃受容体アゴニストである(R)-(-)-α-methylhistamine (RAMH) によるシナプス伝達調節メカニズムを明らかにすることを目的とした。ラット島皮質スライス標本を用いて、錐体細胞 (Pyr) と GABA 作動性ニューロンから同時にホールセル記録を行い、興奮性および抑制性シナプス後電流 (uEPSC, uIPSC) に対する RAMH の作用を調べた。GABA 作動性ニューロンは、スパイク発火特性によって fast-spiking (FS) と non-fast spiking 細胞 (Non-FS) に分類した。Pyr → FS / Non-FS における uEPSC および FS / Non-FS → Pyr / FS / Non-FS における uIPSC は、いずれもその振幅が 10 μM RAMH によって減弱した。その効果は、paired-pulse ratio と CV の解析からシナプス前膜に作用した可能性が示唆された。そこで H₃受容体の島皮質における分布を免疫電顕により調べた結果、グルタミン酸ならびに GABA 作動性神経終末に H₃受容体が認められた。これらの結果は、島皮質において H₃受容体はヘテロ受容体として興奮性および抑制性神経終末に存在し、各々の神経伝達物質の放出を抑制していることを示唆している。

O-35

作業側と平衡側では咀嚼様運動中に誘発された開口反射応答の受ける変調に違いがある
 ○松永 知子¹、森田 匠¹、伊東 優²、平場 勝成¹ (1)愛院大 歯 生理、2)愛院大 歯 顎口腔外科)

【目的】咀嚼運動中に非侵害性刺激により誘発される開口反射は、閉口相と咬合相では閉口相よりも強い抑制を受けることが知られている。即ち痛みを伴う侵害刺激による開口反射とは逆の変調を示すことから、咀嚼運動中に強く噛むことを可能にしていると考えられる。従って咀嚼運動の咬合相において咬合接触により歯根膜が刺激される作業側と、そうではない平衡側とでは非侵害性刺激による反射の変調にどのような違いがあるのか興味ある点である。そこで本研究では、咀嚼運動中の開口反射応答を記録し、作業側と平衡側で変調の違いについて検討した。【方法】ハロタン麻酔下のウサギを用いて、左右咬筋および顎二腹筋筋電図、切歯点の運動記録を行い、大脳皮質咀嚼野電気刺激で誘発される咀嚼様運動中に下歯槽神経への低閾値電気刺激によって誘発される開口反射の応答を観察した。下歯槽神経の刺激は咀嚼運動の咬合相開始時に入力されるよう設定し、顎二腹筋筋電図の振幅の記録を行った。安静時の開口反射を基準として、咀嚼運動中の反射応答から算出した反射の抑制率を作業側と平衡側で比較した。【結果】咀嚼運動中の開口反射応答は作業側と平衡側では、作業側でより強い抑制を受けていることが明らかとなった。作業側では食物からの刺激が歯根膜により強く加わることから、開口反射が作業側においてより強い抑制を受けるのは、円滑な閉口運動をするのに役立っていると考えられる。

O-34

大脳皮質一次および二次体性感覚野から三叉神経感覚核への投射の差異
 ○吉田 篤¹、加藤 隆史¹、佐藤 文彦¹、Haque Tahsinul¹ (1)阪大 院歯 高次脳口腔機能)

[目的]口腔顔面感覚は、三叉神経感覚核群(TSNC)と視床を介して体部位局在性を持って一次および二次体性感覚野(S1とS2)に伝達される。S1は感覚の弁別に、S2は他の情報との統合により関与すると考えられているが、S1とS2からTSNCへの下行投射の差異はわかっていない。[方法と結果]ネプタール麻酔下のラットを用いた。口腔顔面に分布する神経の電気刺激で誘発される大脳皮質の表面電位を記録してS1とS2の口腔顔面領域(orof-S1とorof-S2)の体部位局在性を同定し、各部に順行性トレーサー(BDA)を注入した。BDA標識された軸索終末は、注入と反対側優位に、orof-S1からは全TSNCに、orof-S2からは三叉神経中間亜核を除くTSNCに、体部位局在性を持って配列した。次に、口腔顔面に分布する神経の電気刺激で大きな誘発電位が誘発される部位を主感覚核と吻側亜核の共存レベル(Vp/Vo)で同定後、その部位に逆行性トレーサー(FG)を注入した。FG注入部位が示す体部位局在性は、orof-S1とorof-S2へのBDA注入でVp/Voに認められた標識終末の体部位局在性によく一致した。また、S1とS2内に認められたFG標識細胞は、orof-S1とorof-S2内の体部位局在性によく一致して配列した。[考察]orof-S1およびorof-S2からTSNCへの下行投射はいずれも、口腔顔面感覚のS1、S2への伝達のfeedback回路となり、伝達を制御すると考えられる。しかし、三叉神経中間亜核に入力する感覚はorof-S2からの制御は受けないと考えられる。

O-36

クロモグラニンAの炎症性疼痛発症における役割の解析
 ○孫 麗¹、武 洲¹、林 良憲¹、中西 博¹ (1)九大 歯 口腔機能分子)

最近、私たちは唾液ストレス分子として知られるクロモグラニンA (CGA) がカテプシンB (CatB) 依存的にミクログリアにおいてIL-1β産生分泌を誘導することを報告した (Glia, 2010)。さらに、CatB欠損マウスでは末梢炎症に伴う脊髄ミクログリアのIL-1β発現は軽度で、炎症性疼痛に抵抗性を示すことを報告した (孫 他、第53回歯科基礎医学学術大会)。そこで今回は、CGAの炎症性疼痛の発症における役割についてさらに詳細に検討した。【結果】培養ミクログリアにおいてCGAにより誘導されるIL-1β産生はカスパーゼ-1ならびにCatB特異的阻害剤であるYVADならびにCA074Meにより有意に抑制された。一方、ATPあるいはLPAにより誘導されるIL-1β産生はYVADでのみ有意に抑制された。また、CGAの髄腔内注入により野生型マウスでは疼痛が惹起されたが、CatB欠損マウスは抵抗性を示した。一方、ATPあるいはLPAの髄腔内注入により惹起された疼痛はCatB欠損による影響を受けなかった。さらに、高レベルのCGAが後根神経ニューロンにおいて認められた。【結論】末梢炎症に伴って一次侵害ニューロン軸索末端から分泌されたCGAが脊髄ミクログリアにおいてCatB依存的にプロカスペーゼ-1活性化を介してIL-1βを産生分泌させ、炎症性疼痛を惹起することが強く示唆された。

O-37

ミクログリア時計遺伝子による神経活動の調節の
 説明

○林 良憲¹、武 洲¹、中西 博¹ (九大 歯 口
 腔機能分子)

【目的】脳内マクロファージとして考えられてきたミクログリアは神経変性疾患のみならず、正常の脳機能にも影響を与えることが示唆され始めてきた。しかしながらどのようなメカニズムで脳機能が調節されているか、全く不明である。そこで、正常の状態での神経活動の変化が優位に認められる昼夜の活動性を指標にミクログリア機能の関与を解析した。

【方法・結果】正常の脳内におけるミクログリアは時計遺伝子を有しており、ミクログリア-シナプスインターアクションおよびシナプス強度を調節することが明らかとなった。ミクログリアに発現する時計遺伝子はミクログリア特異的に発現するP2Y₁₂受容体およびカテプシンSをそれぞれ独立して制御することで、突起進展およびシナプスの周囲環境の分解調節を行っている事が明らかになった。

【結論】以上の結果より、ミクログリアがシナプス機能の調節に深く関与しており、複雑な脳機能の解明の一端を担うものである。(非会員共同研究者：小柳悟、楠瀬直樹、井上和秀、大戸茂弘)

O-38

胎生期マウスにおける舌筋組織の発生について

○菊地 昭仁¹、阿部 伸一¹、井出 吉信¹ (東海
 大 解剖)

【目的】細胞骨格である中間径フィラメントの機能や分布についての検索は多く行われている。その中でも vimentin と desmin については骨格筋に存在している事が報告されている。しかし、これら vimentin と desmin の組織発生段階における組織内分布についての検索が行われた報告は少なく不明な点が残されている。そこで今回は胎生期マウスの舌における組織構築に焦点を当て、その過程における vimentin と desmin の局在を明らかにした。そして同部位の組織構築過程における vimentin と desmin の役割について考察を試みた。【方法】胎生 11 日から 14 日までの各 4 ステージを anti-vimentin (Abcam ab92547) と anti-desmin (EPIT MICS 1466-1) を使用したタンパクの局在を確認した。【結果および考察】胎生 11 日と 12 日の舌は下顎周囲と一塊の組織として観察され区別することが出来なかった。胎生 13 日以降では舌および周囲組織がそれぞれ分化する像が観察され、舌内部には筋束も確認することができた。vimentin は胎生 11 日において組織全体に弱い発現が観察された。胎生 13 日以降では組織全体での発現は強くなっていった。これに対し desmin は、胎生 12 日において将来の舌及びオトガイ舌筋相当部に限局して発現していた。胎生 13 日以降では、舌筋内部に強く発現している事が観察できた。これらの結果より、vimentin は組織の足場材として存在し、desmin は将来の筋組織を誘導する働きをするのではないかと考えられた。

O-39

舌癌周囲筋線維に High mobility group box 1
 (HMGB1) が与える影響

○瀧澤 将太^{1,2}、崎山 浩司¹、井上 勝元²、坂東
 康彦¹、天野 修¹ (明海大 歯 形態機能成育
 解剖、²明海大 病態診断治療 口腔顎顔面外科)

【目的】High mobility group box 1 (HMGB1) は癌の浸潤・転移との関連が近年、示唆されている。しかし、口腔癌に関しての癌およびその周囲組織に関する詳細な報告はない。そこで舌癌および癌周囲の筋組織について HMGB1 が与える影響について検索した。【方法】BALB/cAjd1 スードマウスを用い、舌尖を刺入点とし 1 週間に 1 度のペースで計 4 回、SCC7 癌細胞を注入し、この群を SCC7 群、ポジティブコントロールとして DMEM 培養液を注入した DMEM 群、ネガティブコントロールには何も刺入しない無刺激群と設定した。観察部位は舌の前方、中央の 2 部位とし抗 HMGB1 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。また、レーザーマイクロダイセクション法で各部位の試料を採取し mRNA 量を LightCycler を用いて測定した。【結果および考察】SCC7 群では、H-E 染色像で舌癌が定着しているのが確認された。また免疫組織化学的染色では HMGB1 が舌癌部の他、癌の周囲および離れた部位の筋線維にも強く発現した。mRNA の発現量は、SCC7 群で免疫組織化学的染色と同様に HMGB1 の強い発現が確認された。今回の結果から、癌細胞より放出された HMGB1 が、細胞密度の高い骨格筋組織に間隙を作ることで、癌浸潤の促進に関与していると示唆された。

O-40

破骨細胞の膜の裏打ち構造の多様性

○明坂 年隆¹、吉田 寿穂¹ (朝日大 歯 口腔
 解剖)

【目的】破骨細胞やある種のがん細胞に出現してくる基質-細胞間の接着構造について podosome や invadopodia 等の名称が用いられてきたが、その構造・機能的な等質性から "invadosome" とも称されている。実際、多様な膜面形態をもつ破骨細胞がアパタイト上に観察され、従来の典型的な刷子縁を持つものから様々な podosome と関連する構造がアパタイト吸収窩に出現する。そこで破骨細胞の膜の裏打ち構造の多様性を検討した。【方法】アパタイト上で白色ウサギ骨髄から破骨細胞を分離培養し数秒間緩衝液中で超音波処理することで基質接着側細胞膜面の裏打ち構造露出させる unroofing 法と急速凍結レプリカ法を併用させて膜面構造の三次元構造観察を行った。【結果と考察】露出させた破骨細胞膜面レプリカ像上では典型的なアクリンリング形成から孤立 podosome 形成が観察され吸収アパタイト領域は明瞭に区別された。吸収窩に面した膜領域にはアクリンリングに囲まれた典型的な刷子縁の他に、podosome のアクチン細胞骨格と形態的に区別できない invadosome と称すべき多様な構造が出現した。アクチンリング内の膜領域には大小不正の数ナノメートルサイズ顆粒が膜面にパッチ状集積し吸収窩に近づくにつれてその膜面が融合、大型化しそれらの膜直下でアパタイト破壊が進行していた。Invadosome 領域では刷子縁が形成されなくとも基質破壊と吸収は進行していた。

O-41

霊長類における卵円孔の比較形態学的研究
 ○近藤 信太郎¹、内藤 宗孝²、松野 昌展¹ (日大 大 松戸歯 解剖1、²愛院大 歯 歯科放射線)

【目的】卵円孔は下顎神経が頭蓋腔を出る通路となる。霊長類における卵円孔の種間の違いを検討するため、旧世界ザル、類人猿とヒトの卵円孔の構造を比較した。【材料と方法】旧世界ザル(ニホンザル)、小型類人猿(テナガザル)、大型類人猿(チンパンジー)、ヒトの頭蓋骨を肉眼およびCT画像により観察した。【結果と考察】ニホンザル卵円孔の前方部は蝶形骨大翼(GW)、後方は側頭骨錐体によって形成された。頭蓋腔を出るときには1つの孔であったが、すぐに分岐し、外頭蓋底に出る大きな孔と翼状突起外側板(LP)を貫く pterygoalar foramen(PF)に分かれる管状構造を呈した。テナガザルの卵円孔はGWのみで形成され、LPの内側の頭蓋底に開口した。LP後端部は切痕状となって前方に向かって凹型を呈する場合と大きなPFが形成される場合があった。チンパンジーでは卵円孔はGWに在り、LP外側の頭蓋底に開口した。旧世界ザルと類人猿では棘孔が存在しない個体が多いが、ニホンザルでは卵円孔の後方に小孔が存在する個体があった。この小孔が棘孔と相関かどうかは不明である。ヒトでは類人猿と同様に卵円孔はGWに在り、LP後方の頭蓋底に開口した。卵円孔の形態はLPの発達程度によって異なると考えられる。LPが発達している旧世界ザルや小型類人猿ではLPを貫くPFが存在したが、LPの発達が悪い大型類人猿やヒトではPFは認められなかった。

O-43

遠赤外線エネルギーを照射する流紋岩セラミックの骨形成能に及ぼす影響
 ○Aldartsogt Dolgorsuren¹、山下 菊治¹、Dalkhsuren Shine-Od¹、関 伸一郎¹、角田 佳折¹、北村 清一郎¹ (徳大院 HBS 口腔顎顔面形態)

[Objective] We aimed to make clear how the Rhyolite ceramics radiating FIR energy affected the new bone formation. [Materials and methods] MC3T3-E1 cells were cultured in the FIR CO₂ incubator with the Rhyolite ceramics radiating the FIR energy at wavelengths between 4 and 20μm (maximum at 7-12μm) and the normal incubator. The proliferation and the gene expression were analyzed using the cell counts, the RT-PCR and the micro array analysis. Still more the titanium and Rhyolite compound were implanted under the periosteal of a rat skull by injection method. The samples were observed by the light microscope. [Results and discussion] It was made clear that the FIR energy radiation by the Rhyolite ceramics activated the new bone formation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells, by the results that the formation of calcified nodules and the gene expression of osteocalcin were promoted. Still more, the extensive bone formation induced by the FIR ceramic 75% with 25% titanium powder was strongly promoted by FIR radiation. [Conclusion] The FIR energy radiation by the Rhyolite ceramics promoted the bone-forming activity of osteoblasts.

O-42

CXCL2は口腔扁平上皮癌における破骨細胞性骨吸収を促進する因子の一つである
 ○大上 えりか^{1,2}、李 智媛²、原田 清¹、山口 朗^{2,3} (東医歯大 顎顔面外科、²東医歯大 口腔病理、³東医歯大 GCOE 歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点)

[背景と目的] 口腔癌細胞は骨吸収を促進する因子を産生し、間質細胞との相互作用により骨破壊を惹起すると考えられている。我々は口腔癌細胞の産生するPTHrPやIL-6が破骨細胞形成に重要な役割を担っていることを報告してきたが、本研究では口腔癌細胞が産生するPTHrP、IL-6以外の破骨細胞性骨吸収促進因子を同定することを目的とした。[方法と結果] ヒト口腔癌細胞株HSC3から単一細胞に由来する13種類のクローン化細胞株を分離し、骨吸収能の高いクローン化細胞株(No.13)と低いクローン化細胞株(No.17)を選定した。次いで、両者の細胞株における遺伝子発現の差をマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果、両細胞間に発現レベルの差が異なる多くの遺伝子を確認できたが、本研究ではNo13で顕著に発現が上昇していたCXCL2の機能を解析した。マウス間質細胞にCXCL2を添加すると、マウス間質細胞のRANKL発現が有意に上昇した。さらにマウス間質細胞と骨髄細胞の共培養系にNo.13の培養上清を添加すると破骨細胞形成が有意に増加し、その作用はCXCL2中和抗体で有意に抑制された。[考察] 本研究により、口腔扁平上皮癌はCXCL2を産生し、間質細胞のRANKL発現を上昇させることにより、破骨細胞性骨吸収を促進していることが示唆された。今後さらに詳細な研究をすすめることができると考える。

O-44

SCF^{FBW7}によるNFκB2/p100のユビキチン化はNFκBシグナル活性を制御する
 ○福島 秀文¹、大澤 賢次¹、増田 渉¹、自見 英治郎¹ (九歯大 分子情報生化学)

【目的】ユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解制御を行うSCFユビキチンリガーゼ複合体のSCF^{FBW7}は、Notch、c-junなどのタンパク質発現量の制御により細胞の増殖・分化などさまざまな細胞機能に重要な役割を行っており、その破壊は白血病などのがん化を引き起こす。今回我々は、SCF^{FBW7}の新規基質の探索を目的に、網羅的解析を行ったところ、その候補としてNFκB2が得られたので解析を行った。【結果】(1)FBW7の遺伝子欠損、遺伝子変異の見られる細胞においてNFκB2の発現が亢進していた。(2)GSK3によるNFκB2の707・711番目のSerがリン酸化される事によりSCF^{FBW7}がNFκB2を認識し、ユビキチン化を行う事が明らかになった。(3)SCF^{FBW7}はNFκB2のタンパク質発現制御を行う事により、NFκBシグナル活性を制御する事が明らかになった。【考察】NFκB非古典的経路の活性化に重要な分子であるNFκB2は、SCFβ-TRCPによるNFκB2のプロセッシングがNFκB2の活性化に重要であると事が知られていたが、今回の結果から、NFκB2はFBW7とβ-TRCP、2つのSCFコンプレックスの制御を受けており、FBW7はNFκB2のタンパク質発現量の制御、β-TRCPはプロセッシングによるNFκB2の制御によりNFκBシグナルを調節している事が考えられた。

O-45

石灰化培養実験における DMP1 のリン酸化について

○佐藤 淳¹、石田 健¹、宇佐美 悠²、大家 香織¹、岸野 万伸¹、小川 裕三¹、豊澤 悟¹ (¹阪大院歯 口腔病理、²阪大 歯病 検査)

【背景・目的】骨基質に含まれる osteopontin, bone sialoprotein, Dentin matrix protein 1 (DMP1) などの強酸性蛋白質には、カゼインキナーゼ II (CKII) によりリン酸化修飾を受けるコンセンサス配列が多数存在する。また、骨の石灰化前線では CKII 活性が認められることから、CKII によりリン酸化された強酸性蛋白質は負に荷電して Ca²⁺ 結合能を獲得し、骨の石灰化に関与すると考えられている。我々は、昨年の本学会にて、骨組織における DMP1 のリン酸化を示唆する所見を in situ にて検出して報告した。今回は、骨芽細胞系細胞の石灰化培養実験における DMP1 のリン酸化を詳細に検討した。【材料・方法】マウス骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1 細胞) の石灰化過程において、DMP1 とリン酸化セリンの分布を抗体による蛍光 2 重染色で検出した。また、MC3T3-E1 細胞の石灰化過程における抽出蛋白質を Phos-tag SDS-PAGE にて展開し、DMP1 のリン酸化の検出を行った。【結果・考察】MC3T3-E1 細胞の石灰化培養系で形成された石灰化物にリン酸化セリンと DMP1 の共局在が認められ、石灰化培養系でも基質中の DMP1 がリン酸化されていることが示唆された。石灰化培養系の蛋白質抽出物を Phos-tag SDS-PAGE にて展開後、抗 DMP1 抗体によるウエスタンブロットを行った結果、DMP1 の一部はリン酸化修飾を受けている事が分かった。本培養実験系は DMP1 のリン酸化と石灰化の関係を解明するのに有用であると考えられた。

O-46

骨細胞の各分化段階を識別する分子マーカーについて

○大家 香織^{1,2}、石田 健³、佐藤 淳¹、宇佐美 悠⁴、岸野 万伸¹、小川 裕三¹、豊澤 悟¹ (¹阪大院歯 口腔病理、²阪大 歯 口腔総合診療部、³阪大 歯 第二補綴、⁴阪大 歯 検査部)

【目的】骨芽細胞から分化した骨細胞 (osteocyte:以下、OC) にはいくつかの分化段階があり、形態学的に osteoblastic-, osteoid-, young-, mature OC に分類できるが、分化段階の異なる骨細胞の機能や性質は異なると考えられる。本研究では、形態学的に分類された骨細胞を識別できる分化マーカーを検討した。【方法】生後 4 週齢ラット (Wistar, 雄) の脛骨皮質骨の脱灰サンプルを用いて免疫染色を行った。骨芽細胞～骨細胞系譜細胞のマーカーとして Runx2, Osterix, DMP1、ゴルジ体マーカーとして GM130、細胞間ギャップ結合マーカーとして Connexin43 に対する抗体を用いた。【結果と考察】osteoblastic～young OC への分化に伴い、Runx2 と Osterix 陽性反応は徐々に減弱していった。DMP1 と GM130 の蛍光二重染色により、osteoid～young OC ではゴルジ域に DMP1 陽性反応を認めたが、young～mature OC ではゴルジ域に DMP1 陽性反応は認められず、OC 周囲や OC 突起周囲に DMP1 陽性反応を認めるようになることが分かった。また、OC 突起接合部で認められる Connexin43 陽性反応は、分化が進んだ mature OC では減弱傾向がみられた。以上のマーカーは骨細胞の各分化段階を示すのに有効であると考えられた。

O-47

破骨細胞分化には NF-κB2 のプロセシングと RelB の核移行が関与する

○谷口 礼¹、福島 秀文²、牧 憲司¹、自見 英治郎² (¹九歯大 口腔機能発達、²九歯大 分子情報生)

【目的】NF-κB inducing kinase (NIK) 遺伝子に不活性変異をもつ aly/aly マウスは、NF-κB2 の p100 から p52 へのプロセシングが阻害され、破骨細胞形成が抑制される。一方、p100 と p52 の存在しない NF-κB2 遺伝子欠損マウス (NF-κB2 KO) では野生型と同程度の破骨細胞が存在することから p100 が破骨細胞形成に重要な役割をしていることが考えられる。そこで破骨細胞分化における p100 と RelB の細胞役割について検討した。【方法と結果】野生型、aly/aly および NF-κB2 KO マウス由来の破骨細胞前駆細胞を RANKL で刺激すると aly/aly 由来の細胞では p100 のプロセシングと RelB の核移行が見られなかったが、NF-κB2 KO マウス由来の細胞では、RelB の早期の核移行が見られた。aly/aly 由来の細胞に RelB を過剰発現したところ、p100 のプロセシングが回復し破骨細胞形成の抑制も解除された。NF-κB2 KO マウス由来の細胞にプロセシングされない p100 の変異体を過剰発現すると破骨細胞形成が抑制され、さらに RelB を過剰発現させても抑制効果は回復しなかった。【考察】破骨細胞分化には NF-κB2 の p100 から p52 のプロセシングと、RelB の核移行が重要であることが示唆された。

O-48

CCN2-OPG 間相互作用による破骨細胞形成新規制御機構の解明

○青山 絵理子¹、久保田 聡²、西田 崇²、滝川 正春² (¹岡大 歯 機能系共同利用施設、²岡大院医歯薬 口腔生)

CCN2 (CCN family 2) は軟骨、骨芽、血管内皮細胞などの増殖、分化、遊走を促進する因子として知られている。我々は CCN2 が様々な生理活性因子と結合し、その作用を制御することで機能していると考え、CCN2 結合因子のスクリーニングを行ってきた。その結果、CCN2 は破骨細胞形成に必須の因子である RANK と結合することを明らかにし、両者の結合が RANKL 刺激によって生ずる細胞内シグナルを増強し破骨細胞分化を促進することを明らかにした。これに加えて我々は、CCN2 が RANK のデコイレセプターである OPG (osteoprotegerin) と強い結合性を有することを見出した。この CCN2-OPG 間相互作用の、破骨細胞形成における意義につき RAW264.7 細胞を用いて検討したところ、CCN2 を培養系に共存させることによって OPG による破骨細胞分化抑制作用は阻害された。リコンビナントタンパク質を用いた検討では CCN2 が RANKL と OPG の結合を抑制する一方で、OPG は CCN2 と RANK の結合を強く阻害した。以上の事実から OPG は CCN2 による RANK シグナル促進経路を阻害することによっても、破骨細胞形成を抑制している可能性が示された。すでに我々は CCN2 が多核化の過程においても機能していることを報告しており、OPG との結合がこれら多彩な CCN2 の機能においてどのような役割を演じているのかにつきさらに検討を進め、成果を報告する予定である。

O-49

CCN2/CTGF 欠損が軟骨細胞のエネルギー代謝に及ぼす影響

○前田 彩^{1,2}、久保田 聡¹、服部 高子¹、西田 崇¹、飯田 征二²、滝川 正春¹ (岡大 院医歯薬 口腔生化学、²岡大 院医歯薬 顎口腔再建外科)

CCN2/結合組織成長因子(CTGF)は細胞外シグナルを統率する機能を持つと考えられており、間葉系組織の発生、再生に重要な役割を果たす多機能分子である。CCN2 欠損マウスでは骨格形成異常がみられ、骨芽細胞ならびに軟骨細胞の基質産生能力や増殖能が著しく低下する。これらは CCN2 が軟骨代謝の根幹に影響を及ぼすことを示唆する。そこで今回我々は基本代謝全般における CCN2 の役割を解明することを目的として解析を進めた。まず CCN2 欠損マウスと野生型マウスの胎児肋軟骨から軟骨細胞を分離培養し、RNA を抽出して、DNA マイクロアレイ解析により mRNA 発現プロファイルを解析した。その結果、CCN2 欠損マウスでは ATP 合成酵素 γ サブユニットの遺伝子発現が著しく低下し、逆に多くのリボソームタンパク質遺伝子の発現が増進することが示された。さらに細胞内 ATP 濃度の低下もみられた。また軟骨細胞様 HCS-2/8 細胞に対し、RNAi の手法で CCN2 遺伝子発現を一過性にノックダウンし、リアルタイム RT-PCR 法にて解析したところ、ATP 合成酵素 γ サブユニットの発現抑制が再現された。以上より、CCN2 がエネルギー代謝、タンパク質産生の基本装置の維持に大きく関わっていることが示唆された。現在、CCN2 欠損が基本代謝動態に与える影響の全容を解明すべくメタボローム解析を進めており、そこで得られた新たな知見も併せて報告したい。会員外共同研究者：Karen M. Lyons, UCLA

O-50

乳酸共存下での細胞内 ATP 量の低下は軟骨細胞の肥大化様変化を引き起こす

○西田 崇¹、久保田 聡¹、青山 絵理子²、滝川 正春^{1,2} (岡大 院医歯薬 口腔生化学、²岡大 院医歯薬 機能系共研)

変形性関節症は多くの risk factor が関わることで関節軟骨細胞が変性する疾患である。この変性過程で関節軟骨細胞は肥大化様変化を経る事が知られているが、その機構は不明である。今回、我々は糖代謝障害によって起こる軟骨細胞の変性過程に興味深い所見を得たので報告する。解糖酵素のエノラーゼを阻害するフッ化ナトリウム (NaF) をヒト軟骨細胞株 HCS-2/8 に加えると、細胞内 ATP 量は減少し、細胞増殖も抑制された。ラット骨端軟骨細胞に NaF を加えると、硫酸化グリコサミノグリカンの蓄積量は減少し、アポトーシスの指標である TUNEL 陽性細胞数は増加した。これらの結果は糖代謝障害による細胞内 ATP 量の減少が軟骨細胞の増殖・分化を抑制し、アポトーシスを亢進する事を示唆している。そこで、TCA 回路によって培養軟骨細胞の細胞内 ATP 量を増加させる目的で、NaF を添加した HCS-2/8 細胞に乳酸を加えたが、細胞内 ATP 量には影響が見られなかった。しかし、興味深い事にリン酸化 Smad1/5/8 の移行が増加し、肥大軟骨細胞への分化を促進する *RUNX2* 及び肥大軟骨細胞のマーカーである *Col10a1* や *MMP13* の遺伝子発現量が増加した。さらに、タンパク質レベルでも X 型コラーゲンの増加と SOX9 の減少が見られた。これらの結果は乳酸共存下での糖代謝障害による細胞内 ATP 量の低下が軟骨細胞の肥大化様変化に重要な役割を果たしている事を示唆している。

O-51

22q11.2 欠失症候群で欠失するヒト *DGCR2* 遺伝子マウスホモログ *Sez12* の軟骨分化への影響

○梶原 景正¹ (東海大 医 基礎医学系)

マウス *Sez12* 遺伝子は、22q11.2 欠失症候群の発症原因となるヒト 22 番染色体の微小欠失領域に存在する *DGCR2* 遺伝子のマウスホモログであり、新規 C 型レクチンとして外来シグナルを細胞内に伝達する膜タンパク質をコードしている。既に *Sez12* ノックアウトマウス (*Sez12* KO マウス) を作製し、その骨格系表現型として上顎骨の短縮などによる顔貌異常、またそれに付随して CT 画像から鼻中隔の湾曲・咬合歯列不正・歯牙破折などが認められた。これら表現型と *Sez12* 発現分布との関連性を検討するため、内在性 *Sez12* プロモーターで発現制御されたノックイン緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現動態を解析した。ノックイン GFP 発現は、マウス発生段階では神経堤・第一鰓弓・頭部間葉組織などでみられ、生後では全身骨格の軟骨領域、特に成長板における軟骨内骨化モデルで、肥大分化の軟骨細胞に最も強い GFP シグナルを認めた。しかし鼻中隔などの通常の軟骨細胞では GFP 発現はあまり認められなかった。これら知見に一致して、*Sez12* 発現レベルが高い胸腺細胞でも、*Sez12* 欠失した胸腺細胞では増殖・分化に変化が認められた。以上のことから、*Sez12* 遺伝子は骨格形成を含めた生体細胞の増殖分化の制御、または分化細胞の維持・生存に役割を果たすことが示唆された。

O-52

抗菌ペプチド LL37 はラット頭蓋骨欠損モデルにおける骨再生を促進する

○橋高 瑞穂¹、藤田 剛¹、柴 秀樹¹、栗原 英見¹ (広大院医歯薬保 歯周病態)

【目的】抗菌ペプチド LL37 はその強力な抗菌活性に加え、炎症症、細胞増殖、細胞遊走、血管新生など、組織再生に重要と考えられる様々な細胞機能制御能を有する多機能分子である。これらのことから LL37 が骨組織再生に有用であると考えた。本研究では、LL37 の骨再生能を調べることを目的とし、ラットの頭蓋骨欠損モデルにおける骨再生に LL37 が及ぼす影響について検討した。【材料および方法】ラット (F344、雄 8 週齢) 頭蓋骨に作製した直径 1.6 mm の骨欠損に、アテロコラーゲンを担体として LL37 (合成ペプチド、10 μ g/ml) を移植した (LL37 移植群)。コントロールとして、アテロコラーゲンのみ移植した群 (担体移植群) と非移植群を設定した。骨再生量は、移植後 4 週の HE 染色像を画像解析ソフトによって解析し数値化した。また、早期における血管新生を移植後 1 週での CD34 の免疫染色で調べた。【結果】LL37 移植群は他の二群と比べて有意に骨再生が多かった。また移植後 1 週で、LL37 移植群では担体移植群と比べて欠損内部および担体であるアテロコラーゲン内部に多くの CD34 陽性細胞が確認された。【結論と考察】LL37 はラット頭蓋骨欠損モデルにおける骨再生を促進した。また、LL37 の誘導する骨再生の促進に早期の血管新生が関与していることが示唆された。

O-53

ガレクチン9による破骨細胞分化制御

○成松 加奈子^{1,2}、李 銀姫¹、久木田 明子³、屈
 鵬飛¹、渡邊 敏之¹、高橋 一郎²、久木田 敏夫¹
 (¹九大 歯 分子口腔解剖、²九大 歯 矯正、³佐
 賀大 医 微生物)

【目的】ガレクチンはβ-ガラクトシドを有する糖鎖に特異的に結合するレクチンであり細胞の増殖・分化や免疫系の制御において重要な働きを有することが知られている。ガレクチンは糖鎖結合領域 (CRD) の数や結合様式の違いからプロト型、キメラ型及びタンDEMリポート型の3つの型に分類される。演者らはキメラ型のガレクチン3がCRDを介さずに破骨細胞分化を制御することを明らかにした。今回、2個のCRDを有するタンDEMリポート型のガレクチン9について1個のCRDのみから構成されるプロト型のガレクチンであるガレクチン1とともに破骨細胞分化制御能を検討した。【方法】破骨細胞分化系として破骨細胞前駆細胞株 RAW-D 細胞及びマウス、ラットの骨髄細胞を用いた。ガレクチン9の受容体について RT-PCR 法、ウェスタンブロット法等により検討した。【結果と考察】ガレクチン1は破骨細胞形成に影響を与えなかったのに対し、ガレクチン9は顕著に破骨細胞形成を抑制した。ガレクチン9による破骨細胞形成抑制はアンタゴニストであるβラクトースの添加により有意に解除されたことから、ガレクチン9はCRDを介して破骨細胞分化を阻害するものと考えられた。ガレクチン9の受容体として知られている膜表面分子について検討したところ破骨前駆細胞にTIM-3の高い発現が認められた。ガレクチン9により破骨細胞分化が制御される可能性が強く示唆された。

O-55

破骨細胞支持能に対する高分子量ヒアルロン酸の抑制効果について

○有吉 渉¹、沖永 敏則¹、西原 達次¹ (¹九歯大
 歯 感染分子生物)

【目的】細胞外マトリックスの構成成分であるヒアルロン酸 (HA) は、破骨細胞の分化や骨吸収能に影響を及ぼすことが知られているが、破骨細胞支持細胞に対する作用については詳細な知見が得られていない。今回、破骨細胞支持活性に対する高分子量 HA の作用について検討を行った。【方法】マウス間質系細胞株 ST2 細胞に対し、高分子量 HA あるいはヒアルロン酸合成酵素阻害薬 (4-MU) を添加して培養を行った。培養後の細胞における破骨細胞分化因子 (RANKL) の発現を real-time RT-PCR 法、Western blot 法、および蛍光免疫染色法を用いて解析した。【結果】ST2 細胞に対する高分子量 HA の添加により、RANKL の発現は著明に抑制された。この抑制作用は、CD44 阻害抗体の前処理により回復した。一方 4-MU 添加群では、RANKL 発現の強い亢進が観察された。シグナル解析のために、阻害剤による検討を行ったところ、Rho kinase 阻害薬である Simvastatin、および RhoA の阻害薬である Y27632 の前処理により、高分子量 HA による RANKL の発現抑制活性は阻害された。さらに、破骨細胞前駆細胞 RAW264.7 細胞との共培養系において、高分子量 HA の添加により 1,25 (OH)2D3 により誘導される破骨細胞形成は著しく抑制された。【結論】以上の結果から、高分子量 HA は受容体 CD44、そして Rho kinase の活性化を介して破骨細胞支持細胞における RANKL 発現を抑制することにより、破骨細胞分化を負に制御することが示唆された。

O-54

転写因子 Arid5b は Sox9 標的遺伝子プロモーター領域のヒストン脱メチル化を促進し軟骨細胞分化を制御する

○波多 賢二¹、西村 理行¹ (¹阪大 歯 生化)

【目的】転写因子 Sox9 は II 型コラーゲン (Col2a1) などの軟骨基質の発現を制御し、軟骨細胞分化において必須の役割を担う。本研究では Sox9 の機能発現を制御する新規転写制御因子の同定とその機能的役割の解明を試みた。【結果・目的】超高速シーケンサー Solexa を用いて、軟骨細胞分化能の高い C3H10T1/2 細胞と低い NIH-3T3 細胞の遺伝子発現プロファイルリングを網羅的に解析した結果、転写因子 Arid5b (AT rich interactive domain 5b) が C3H10T1/2 細胞に高発現することを見出した。免疫組織染色により Arid5b は増殖軟骨層に強く発現していることが示された。C3H10T1/2 細胞に Arid5b を過剰発現すると、Sox9 の転写活性と Col2a1 の発現が顕著に促進された。Arid5b と Sox9 の物理的結合が、His-Sox9 を用いた Pull-down アッセイにより認められた。さらに、Arid5b はヒストン脱メチル化酵素 Phf2 を Col2a1 遺伝子プロモーター上に誘導し、H3K9Me2 の脱メチル化を促進することにより Col2a1 遺伝子の転写を促進することが ChIP アッセイにより見出された。Arid5b 遺伝子欠損マウス (Arid5bKO) は内軟骨性骨化の遅延による成長障害が認められ、Arid5bKO 由来の初代培養軟骨細胞では Sox9 誘導性の軟骨細胞分化能が顕著に低下していた。【結論】転写因子 Arid5b は Phf2 による Sox9 標的遺伝子プロモーターのヒストン脱メチル化を制御し、さらに Sox9 の転写機能を促進することにより軟骨細胞分化を誘導することが明らかとなった。

O-56

概日リズムを制御する新規時計エレメント EL-box の同定

○河本 健¹、能城 光秀¹、藤本 勝巳¹、加藤 幸夫¹ (¹広大院歯歯薬保 口腔生化)

概日リズムは、地球の環境に適応するために動植物で発達したシステムである。24 時間の周期に体のリズムを合わせることは、ヒトの生命を維持していく上でも極めて重要であり、概日リズムは複数のシステムによって多重に制御されている。我々は、軟骨における概日リズムの有無を検討すると同時に、未知の調節システムの存在について検索した。明暗および恒暗条件下で飼育したラットの肋軟骨成長板から 4 時間おきに RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて 277 個のリズム遺伝子を同定した。これらの遺伝子のうち、ラット、マウス、ヒトにおいて共通に保存されているプロモーター領域から DNA エレメントの存在とリズムの位相との相関を調べ、統計的に有意に相関する配列を抽出した。これらのうち、EL-box と命名した配列は、代表的な時計エレメントである E-box と似た配列を持っていた。そこで、これらが E-box 調節因子による制御を受けるかどうかについて検討した。その結果、EL-box は、Bmal1、Clock、Npas2、Per、Cry には E-box と同じように応答することが判明した。一方、Dec は E-box のみに作用した。また、E-box と EL-box の両方を持つと相乗効果が認められた。これらの結果から EL-box は、E-box と共同して、あるいは独立に概日リズムを調節する新規のエレメントであると考えられる。

O-57

変異型 Smad1/5/8 を用いた BMP 細胞内シグナルの解析
 ○片桐 岳信¹ (埼玉大 ゲノム 病態生理)

【目的】BMP を結合した受容体は、Smad や p38 MAP キナーゼ等の複数の細胞内情報伝達系を活性化する。BMP 受容体は、互いに相同性の高い Smad1/5/8 を基質としてリン酸化する。我々は、Smad1 を用いて、BMP 受容体によるリン酸化部位を酸性アミノ酸に置換し、受容体によるリン酸化を受けずに下流のシグナルを活性化できる変異体を報告した。本研究では、Smad1、Smad5 と Smad8 の変異体を作製し、各 Smad が誘導する BMP のシグナルを解析した。

【方法】PCR 法で、Smad1、Smad5 および Smad8 の C 末端のセリン残基をアスパラギン酸に置換した。各変異体を C2C12 細胞で過剰発現させ、活性をルシフェラーゼ・レポーター活性、および ALP 誘導活性で検討した。

【結果】Smad1 と Smad5 は、BMP 特異的な Luc レポーターと ALP 活性を強く誘導した。この Smad1 と Smad5 の活性は、BMP のアンタゴニストや受容体阻害剤で抑制されなかった。一方、Smad8 は、殆ど ALP 活性を誘導しなかった。しかし、Smad8 のリンカーを Smad1 や Smad5 のリンカーと置換すると、ALP 活性の誘導が確認された。

【考察】BMP の骨芽細胞分化誘導活性は、Smad1 と Smad5 によると考えられた。Smad1/5/8 は互いに相同性が高いが、Smad8 はリンカーの一部が欠失しており、これが低活性の原因である可能性が示唆された。

O-58

骨治癒過程における骨髄由来細胞の動態および機能解析
 ○辻極 秀次¹、片瀬 直樹¹、飯田 征二²、長塚 仁¹ (¹岡大 院医歯薬 口腔病理、²岡大 院医歯薬 顎口腔再建外科)

【目的】近年、骨髄幹細胞の多分化能が明らかとなり、様々な組織の修復や維持への関与が報告されている。しかし骨折治癒過程における骨髄幹細胞の関与についての詳細は不明である。そこで本研究では GFP マウス骨髄細胞移植マウスを用い、骨治癒過程における骨髄由来細胞の関与について組織学的に検討した。【材料と方法】8 週齢雌性 C57BL/6 野生型マウスに放射線照射後、同系 GFP マウスから採取した骨髄細胞を尾静脈から移植した。細胞移植 1ヶ月後に、骨治癒モデルとして脛骨に直径 1 mm の骨欠損を形成した。試料は 3、7、14、28 日後に摘出、パラフィン切片を作製し、HE 染色、TRAP 染色および GFP、F4/80、CD34、Osteocalcin (OC) に対する免疫組織化学的染色を施し組織学的に観察した。【結果と考察】骨欠損作製 3 日では創傷部炎症巣において炎症性細胞と F4/80 陽性のマクロファージに GFP 陽性が認められ、7 日では CD34 陽性血管内皮細胞の一部に GFP 陽性が認められた。14 日では新生骨周囲で OC 陽性 GFP 陰性の骨芽細胞が認められ、28 日では吸収した骨組織周囲に、TRAP 染色陽性 GFP 陽性の破骨細胞を認めた。以上のことから骨髄由来細胞は多様な細胞に分化しており、創傷治癒の促進、血管形成制御、骨組織のリモデリング等、新生骨形成のための微小環境形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

O-59

マウス septoclast における表皮型脂肪酸結合タンパクの局在と個体発生
 ○坂東 康彦¹、崎山 浩司¹、瀧澤 将太¹、徳永 寛司¹、天野 修¹ (明海大 歯 解剖)

<背景>骨代謝は食事等で摂取した不飽和脂肪酸の影響を受ける。水に不溶性の脂肪酸は脂肪酸結合タンパクと結合することにより細胞内への取り込みと輸送が可能になる。本研究では n3 系不飽和脂肪酸、レチノイン酸との親和性の高い表皮型脂肪酸結合タンパク (E-FABP) のマウス脛骨骨端板における免疫組織化学的局在、遺伝子発現および発生での局在変動を明らかにした。

<方法>1. 免疫組織化学：胎生期と生後のマウス脛骨近位端矢状断の凍結組織切片を作成し、抗 E-FABP 抗体 (山口大大和田教授提供) を用いて免疫染色した。また、骨芽細胞、破骨細胞、septoclast、血管内皮細胞のマーカーと比較した。2. RT-PCR：骨端板の軟骨部、骨軟骨境界部および骨梁部の E-FABP の mRNA 発現を調べた。

<結果>1. 免疫組織化学：4 週齢マウスでは骨端板肥大層の直下に 1 層の E-FABP 免疫陽性細胞層が観察され、カテプシン B などの septoclast マーカーのみに共染した。また E-FABP 陽性細胞は胎生期では骨軟骨境界部から少し離れた部位にも散在したが、生後は次第に骨軟骨境界部に集約した。2. RT-PCR：骨軟骨境界部に E-FABP mRNA が高く発現していた。軟骨部と骨梁部にはほとんど認められなかった。

<考察>軟骨内骨化において横隔の非石灰化軟骨基質の吸収に関与すると考えられている septoclast が E-FABP を特異的に発現していること、また E-FABP と結合する脂質が軟骨内骨化に重要な役割を担っていることが強く示唆された。

O-60

窒素非含有 bisphosphonates の骨吸収抑制作用とは関連しない鎮痛効果
 ○岡田 諭^{1,2}、金 始瑛^{1,3}、清流 正弘^{1,3}、山口 晃史^{1,2}、高橋 哲²、山本 照子³、菅原 俊二¹、遠藤 康男¹ (¹東北大 院歯 口腔分子制御、²東北大 院歯 顎顔面外科、³東北大 院歯 顎矯正)

【背景】Bisphosphonates (BPs) には分子内に窒素を含む NBP と窒素を含まない non-NBP がある。骨吸収抑制作用は NBP >> non-NBP だが、NBP には顎骨壊死のリスクがあり、non-NBP での明確な報告はない。痛みは骨粗鬆症最大の苦痛であるが、NBP 自体が骨痛、筋肉痛、関節痛をもたらすとの報告もある。興味深いことに、藤田らは (本会名誉会員) 骨粗鬆症や変形性関節炎患者において、non-NBP の etidronate は NBP よりも強い鎮痛効果を示すことを報告し、また、BPs による骨吸収抑制作用無関係の鎮痛効果を示唆する動物実験もある。しかし結果は断片的である。【目的と方法】私達はマウスでの以下の 2 種の疼痛反応について、BPs の効果を詳細に検討した。(i) 酢酸希釈溶液腹腔注射が誘導する疼痛反応 (abdominal constriction、神経での Fos 蛋白発現、血中 corticosterone 増)。(ii) トウガラシ成分 capsaicin 足蹠投与による疼痛反応。【結果】上記実験系で、non-NBP の etidronate と clodronate は種々の投与方法で鎮痛効果を示し、機序として神経への直接作用が示唆された。NBP の alendronate、risedronate、minodronate に明瞭な鎮痛効果はみられなかった。【考察】Non-NBP は副作用リスクが低く鎮痛効果の高い骨粗鬆症治療薬として、再評価すべきであると思われる。

O-61

FLT-1は歯周炎治療の標的分子となり得るか
○大島 光宏¹、山口 洋子²、安孫子 宜光³ (奥羽大 薬 生化、²日大 歯 生化、³日大 松戸 歯 生化)

歯周炎の病態形成において、コラーゲンなど細胞外マトリックスの分解は不可欠な現象である。これまでに演者らは、ヒト重度歯周炎罹患歯肉から「アグレッシブな線維芽細胞」を分離し、三次元培養法を用いた「生体外歯周炎モデル」を確立した(Ohshimaら、JDR, 2010)。今回はこのモデルと健常歯肉線維芽細胞の組み合わせ3ペアを用いて、マイクロアレイで遺伝子発現変化を網羅的に解析した。「アグレッシブな線維芽細胞」を含む三次元培養ゲルでは45遺伝子の発現が上昇し、5遺伝子の発現が低下していた。さらにクローン化した「アグレッシブな線維芽細胞」を使用したモデルでマイクロアレイ解析を行って重ね合わせたところ、候補遺伝子を22種まで絞ることができた。定量的リアルタイムPCRで11遺伝子が線維芽細胞で高発現していることがわかり、そのうちで血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体1(FLT-1)に着目した。VEGFRキナーゼ阻害剤は「生体外歯周炎モデル」のコラーゲン分解を抑制し、miRNAによってFLT-1がサイレンシングされたモデルでも、コラーゲン分解能が低下した。今回、重度歯周炎罹患歯肉に由来する線維芽細胞を用いた「生体外歯周炎モデル」中で、顕著に発現上昇している11遺伝子をリストアップできた。これらの遺伝子の中で、VEGFRキナーゼ阻害剤がコラーゲン分解を著しく抑制したことから、FLT-1はヒト歯周炎治療の標的分子となるかもしれない。

O-62

ADAMTSL6βによるマルファン症候群の歯根膜におけるマイクロフィブリル形成不全改善機構の解析
○齋藤 正寛¹ (東理大 基礎工 生物工)

マルファン症候群(MFS)はfibrillin-1の遺伝子変異によるマイクロフィブリル形成不全と、それに伴うTGF-βの病的活性化により、歯周病を含む様々な結合組織疾患を発症する。MFSの症状改善のためには、マイクロフィブリル形成不全を改善する技術開発が求められている。そこで本研究では、MFSにおける歯周病の有効な治療技術を開発するため、マイクロフィブリル形成を誘導するADAMTSL6βのMFSの症状改善効果能について解析した。歯根膜におけるADAMTSL6βのマイクロフィブリルの形成能力を解析するため、ADAMTSL6βを全身で過剰発現させたtransgenic miceを作出した結果、歯根膜内で抗fibrillin-1抗体陽性のマイクロフィブリルの増加が観察された。次にADAMTSL6βの創傷治療効果を検証するため、組み換えADAMTSL6β蛋白質を含むコラーゲンシートを作製し、MFSモデルマウスの歯根膜へ局所投与と実験を行った。その結果、歯根膜内のマイクロフィブリル形成不全は改善され、さらにリン酸化SMAD2/3およびMMP-9の発現を伴う病的なTGF-βシグナルの活性化を抑制することが判明した。以上の結果より、ADAMTSL6βはMFSの歯根膜でマイクロフィブリルの形成不全を改善するばかりでなくTGF-βシグナルの病的な活性化を抑制し、組織修復へと導く可能性が示された。

O-63

CCL2シグナル欠損が過剰咬合力誘発性の歯槽骨吸収に及ぼす影響
○堤 貴司^{1,2}、鍛冶屋 浩¹、高橋 裕²、岡部 幸司¹ (福歯大 細胞分子生物、²福歯大 咬合修復)

【目的】過剰咬合圧は、歯槽骨吸収を伴う咬合性外傷を誘発することはよく知られているが、その要因となる過剰なメカニカルストレス(eMS)と歯槽骨吸収との関連性については未だ明らかではない。今回、我々は咬合性外傷モデルを用いてC-Cケモカイン発現と歯槽骨吸収とeMSとの関連性について検討した。【方法】野性型マウス(WT)、CCL2欠損マウス(CCL2(-/-))及びCCR2欠損マウス(CCR2(-/-))を用い、咬合性外傷モデルを作成した。In vivoでは、マウスの臼歯部に早期接触を付与し、下顎骨標本作製後にTRAP染色、HE染色及びC-Cケモカイン(CCL2、CCL3及びCCL5)の免疫染色を行った。In vitroでは、マウスより初代歯根膜細胞を単離し、eMSを加えて培養し、ケモカインの発現を解析した。【結果と考察】WTの歯槽骨では、TRAP陽性細胞はeMS刺激時間依存性に増加し、同時に歯根膜にCCL2とCCL3の発現が確認でき、特にCCL2の発現が有意に増加していた。一方、CCL2(-/-)とCCR2(-/-)マウスの歯槽骨では、無刺激時において既にTRAP陽性細胞の発現がわずかに認められた。さらに、WTと比較して歯根膜にCCL3の発現が補償的に上昇していた。これらTRAP陽性細胞とCCL3の発現は共に刺激依存性に増加した。以上の結果よりCCL2はeMS依存性に発現しTRAP陽性細胞の誘導に関連することが解った。さらに、CCL2シグナル欠損によりCCL3がこの働きを相補的に担うことより、歯槽骨吸収を誘発することが示唆された。

O-64

低酸素環境下におけるヒト歯根膜細胞間ギャップ結合の機能性および調節機構の検討
○加藤 龍史¹、石原 嘉人²、上岡 寛²、山本 照子¹、山城 隆² (東北大 院歯 顎口腔矯正、²岡大 院医歯薬 歯科矯正)

【目的】歯根膜の細胞間情報伝達は、骨リモデリング時に重要な役割を持つと推測されるが、主要な伝達系の一つであるギャップ結合(GJ)の機能性および調節機構の詳細は不明である。本研究は、矯正力によって生じる圧迫側モデルとして、低酸素環境下でのGJの機能性および調節機構について検討を行った。【方法】実験は、岡大歯病矯正歯科における矯正治療開始患者の便宜抜去小白歯から歯根膜細胞を単離し、初代培養系にて行った。低酸素培養は2% O₂下で行った。細胞間の形態分析は、走査型電子顕微鏡を用いた。GJの分布は、抗Connexin43(Cx43)抗体を用いて検討し、細胞当たりのCx43発現量の経時的変化を解析した。GJの機能性は、蛍光退色法(FRAP)により検討を行った。mRNA発現はRT-PCR、タンパク発現はWestern Blotting法を用いて検討した。【結果と考察】歯根膜細胞間には、細胞表面から伸びる突起状構造物を認め、Cx43で構成されたGJが存在した。低酸素培養した歯根膜細胞では、低酸素マーカーであるHIF-1αおよびApelinの時間依存的発現上昇を認めた。対照群ではFRAPによる蛍光輝度の回復が確認され、その回復はGJ阻害剤投与群および低酸素群で濃度・時間依存的に抑制された。Cx43発現量は、低酸素環境下で時間依的に減少した。【結論】ヒト歯根膜細胞にはCx43を介した機能的ギャップ結合が存在し、その細胞間情報伝達は低酸素環境下で負の制御を受ける事が示唆された。

O-65

Axin2 による間葉系前駆細胞分化制御機構の解析

○内藤 昌子¹、高橋 富久¹ (日大 歯 解剖一)

【目的】 Axin2 は Wnt/ β -catenin シグナルの抑制制御因子であり、個体発生や細胞分化に必要なタンパクと考えられている。本研究では、間葉系前駆細胞株 ROB-C26 (C26) を用いて、脂肪細胞への分化過程にみられる Axin2 の発現と機能について解析した。【方法】 コンフルエントな C26 の培養系に glucocorticoid analogue である dexamethasone (Dex) を添加し、Axin2 の発現量について遺伝子レベルで検討した。また、Axin2 shRNA を使用した発現抑制実験をおこない C26 の分化パターンの変化について観察した。【結果】 Dex は C26 における Axin2 mRNA の発現を経目的に誘導したが、その発現は mifepristone 添加することによって阻害された。Axin2 shRNA の導入によって C26 の脂肪細胞分化の抑制が認められたが、その一方で β -catenin 陽性細胞とアルカリフォスファターゼ活性の増加が観察された。以上のことから、Dex は glucocorticoid receptor を介して Axin2 の発現を誘導するとともに、 β -catenin の核内局在を制御しながら、脂肪細胞分化を調節していることが示唆された。

O-66

脂肪分解・熱産生系を制御する新しい分子 PRIP

○奥村 俊哉¹、原田 佳枝¹、鎌田 伸之²、兼松 隆¹ (1) 広大院医歯薬保 細胞分子薬理、(2) 広大院医歯薬保 口腔外科)

PRIP (PLC-related catalytically inactive protein) は、ホスホリパーゼ C (PLC) δ -1 に高い相同性を示すが PLC の酵素活性を持たない。我々は PRIP ノックアウト (KO) マウスを作製して PRIP の生理機能解析を行った。KO マウスは野生型 (WT) マウスに比べて白色脂肪量が少なかった。その成因を明らかにするために、呼吸交換率を測定したところ、KO マウスのエネルギー代謝における脂肪利用率が亢進している事が分かった。そこで、KO マウスの脂肪分解制御と熱産生機構について検討を行った。KO マウスの白色脂肪細胞では、脂肪分解酵素であるペリリピンや HSL のリン酸化が亢進し、中性脂肪の分解が恒常的におきている事が明らかとなった。PRIP は、タンパク質脱リン酸化酵素 (PP1 と PP2A) を標的分子へリクルートする分子である。そこで、脂肪分解シグナリングにおける脱リン酸化制御について検討を行った。PRIP 分子存在下では、飢餓誘導刺激や交感神経 (アドレナリン) 刺激に依存して PP1 と PP2A が脂肪滴へ移行する。しかし、PRIP 欠損細胞ではその移行は減少し、脂肪分解酵素の脱リン酸化制御が PRIP 依存性である事が明らかとなった。また、KO マウスの褐色脂肪細胞では、熱産生タンパク質 (UCP1) の発現が亢進しており、その結果体温が高くエネルギー産生能が亢進している事が分かった。以上より、PRIP は脂肪分解制御分子であり、生体の熱産生をも制御する新しい機能分子である事が明らかとなった。

O-67

金属溶液の塗布による金属炎症モデルの構築

○高橋 亜希子^{1,2}、小野 瑞穂¹、土橋 明^{1,3}、小笠原 康悦¹ (1) 東北大 歯 難治疾患・口腔免疫、(2) 東医歯大 歯、(3) 自治医大 歯科口腔外科)

【目的】 金属装飾品をつける人が増加し、金属によるかぶれ、アレルギーが問題となっている。我々は厚生労働省研究班を組織し全国調査をおこなったところ、2010 年度 1 年間に接触皮膚炎で来院した患者において、20 代女性が一番多く、ネックレス、ピアスが原因製品であることが判明した。これまで金属炎症、アレルギーのモデルがいくつか報告されているが、金属溶液を注射するものが多く、ヒトでの状況をそのまま反映しているとはいえない。金属炎症、アレルギーは金属が汗などで溶け出しイオン化することで、皮膚に浸透し悪影響を及ぼすと考えられている。今回我々は、マウス皮膚に金属溶液を塗布することで金属炎症、アレルギーを誘導できるかについて検討した。【方法】 金属溶液としてパラジウムを用い、ヘアレスマウスの皮膚に塗布して、皮膚の腫脹、発赤、炎症症状を検討した。さらに病理組織学的検討によりリンパ球の浸潤について解析した。【結果と考察】 ヘアレスマウスにパラジウム溶液を塗布すると周辺にリンパ球の浸潤が認められ、炎症反応がおこることが観察された。

O-68

リンパ球移植による金属アレルギー動物モデルの構築

○土橋 明^{1,2}、高橋 亜希子^{1,3}、小野 瑞穂¹、小笠原 康悦¹ (1) 東北大 歯 難治疾患・口腔免疫、(2) 自治医大 歯科口腔外科、(3) 東医歯大 歯)

【目的】 金属アレルギーは、装飾品をつける人の増加、歯科を含む医療生体材料による医療の発達により増加傾向にある。実際、我々は厚生労働省研究班を組織し全国調査をおこなったところ、2010 年度 1 年間に接触皮膚炎で来院した患者において、ニッケル、コバルト、クロムがアレルギーの 3 大原因金属であること、パッチテスト陽性率は増加傾向にあることを明らかにした。また診断法はパッチテストしかなく、新たな診断法の開発が求められている。我々は金属アレルギーの新規診断法を開発することを目的に研究を展開している。今回我々は、マウス金属アレルギーモデルを用いて、in vivo でリンパ球増殖試験が可能か否かを検証する目的で実験を行った。【方法】 マウスに金属アレルギーを誘導し、その所属リンパ節からリンパ球を採取した。ヌードマウスに感作リンパ球を移入し、感作リンパ球の挙動を観察し、in vivo でリンパ球増殖試験が可能か検討した。【結果と考察】 ヌードマウスに感作リンパ球を移入しただけでは、拒絶反応は起こらないことが判明し、in vivo でリンパ球増殖試験が可能となる最低条件は達せられた。

O-69

金属と細菌成分による免疫細胞の反応性の検討

○小野 瑞穂^{1,2}、土橋 明^{1,2}、高橋 亜希子^{1,3}、小笠原 康悦¹ (¹東北大学 歯 難治疾患・口腔免疫、²自治医大 医 歯科口腔外科、³東医歯大 歯)

【目的】金属アレルギーは、歯科領域では無視できない疾患の一つである。我々は厚生労働省研究班を組織し全国調査をおこなったところ、2010年度1年間に接触皮膚炎で来院した患者において、ニッケル、コバルト、クロムがアレルギーの3大原因金属であること、パッチテスト陽性率は増加傾向にあることを明らかにした。さらに我々は、金属アレルギーの病態解明を目標に動物モデルおよびヒト末梢血を用いて解析を進めている。今回、金属アレルギーと細菌成分、および Toll Like Receptor (TLR) との関連について明らかにすることを目的に研究を行った。【方法】マウスに各種細菌成分を投与し、金属によるアレルギー反応を検討した。また、ヒト末梢血からリンパ球を単離し、金属溶液を加え、炎症性サイトカインの産生を測定した。マウスとヒトの結果を総合的に解析し、各種金属と細菌成分との関与について比較検討した。【結果と考察】金属の種類によって、リンパ球の反応がそれぞれ異なること、炎症性サイトカインの産生が異なることが明らかとなった。また、細菌成分によっても免疫反応が変わることから、金属と細菌成分の組み合わせによってアレルギーの反応が大きく変化することが明らかとなった。

O-70

ドレスNK細胞の発見

○小笠原 康悦¹、小野 瑞穂¹、土橋 明^{1,2}、高橋 亜希子^{1,3} (¹東北大学 歯 難治疾患・口腔免疫、²自治医大 医 歯科口腔外科、³東医歯大 歯)

【目的】ナチュラルキラー (NK) 細胞は、癌免疫、感染免疫などにおいて中心的な役割を担うキラー細胞であり、免疫反応を促進する細胞集団として認識されている。NK細胞は樹状細胞と相互作用してその機能を発揮することが知られているが、その詳細については未だ不明である。そこで我々はNK細胞と樹状細胞との相互作用についての詳細を解明することを目的に研究を行った。【方法】NK細胞活性化因子をマウスに投与しNK細胞の細胞表面抗原の変化を観察した。また、NK細胞と樹状細胞を共培養してその変化を解析した。【結果と考察】我々は、NK細胞が樹状細胞からMHCクラスIIという分子を引き抜き、新たな細胞に変化することを発見した。MHCクラスII分子を獲得したNK細胞 (ドレスNK細胞) は免疫応答を抑制し、金属アレルギーなど接触性皮膚炎に代表される遅延型アレルギーを抑制することが判明した。これまで、自己の目印となるMHC分子は、遺伝子により発現が厳格に調節されていると考えられていたが、MHCクラスII分子は引き抜かれても機能すること、MHCを獲得し後天的に細胞が変化する (ドレス:ドレスを着るように後天的に細胞が変化) ことの発見は、免疫応答が遺伝子調節だけではなく繊細な調節機構によって行われていることを示すものである。このドレスを着脱するように後天的に細胞を自在にコントロールできれば、遅延型アレルギーの新たな治療法となりうると期待される。

O-71

口腔レンサ球菌の抗腫瘍活性

○原 博志、佐伯 歩、長谷部 晃¹、柴田 健一郎¹ (¹北大 院歯 口腔分子微生物)

我々は、TLR2リガンドFSL-1のin vivoにおける腫瘍の増殖に及ぼす影響を調べ、FSL-1と腫瘍抗原と一緒に免疫した場合には抗腫瘍活性がみられ、その活性はTLR2依存的事であることを明らかにした。最近、我々は口腔レンサ球菌の全菌体の認識にTLR2が重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究では、口腔レンサ球菌の野生 (WT) 株とリポタンパク質欠失 (dLP) 株の腫瘍の増殖に及ぼす影響を調べた。6-8週齢のC57BL/6マウスの背部皮下にメラノーマB16F0を接種後、4日後及び9日後に、*S. gordonii* Challisの生菌あるいは死菌、またFSL-1で免疫して、腫瘍の大きさの変化を経的に測定した。制御性T細胞 (Treg) はanti-CD4とanti-Foxp3抗体で二重染色し、フローサイトメーターで解析した。WT株またはFSL-1で免疫したマウスでは、生菌ならびに死菌共にコントロールに比べて腫瘍の増殖が抑制されたが、dLP株では腫瘍増殖の抑制はみられなかった。腫瘍接種後15日後に所属リンパ節におけるTregの割合を解析したところ、WT株、dLP株ならびにFSL-1で免疫したマウスでは、Tregの割合がコントロールと比べて有意に減少していたが、dLP株ではその減少の程度が弱かった。これらの結果から、口腔レンサ球菌は抗腫瘍活性を有し、その活性発現にはリポタンパク質が重要な役割を果たしていることが示唆された。

O-72

マクロファージにおけるLPSによるCot/Tpl2-ERK経路を介したケモカインの誘導

○坂東 健二郎、楠山 譲二¹、柿元 協子¹、大西 智和¹、松口 徹也¹ (¹鹿大 院歯 口腔生化学)

グラム陰性菌細胞壁外膜であるリポ多糖 (LPS) はヒトや動物の細胞に作用すると、様々な生理活性を示す。そのシグナルはMyD88依存的事あるいは非依存的事にNF- κ B (Nuclear factor-kappa B)、MAP (Mitogen-activated protein) kinases、IRF3 (Interferon regulatory factor 3)などを活性化する。一方、Cot/Tpl2はLPSにより活性化されるERK (Extracellular signal-regulated kinase) の上流のkinaseである。今回、Myd88 KOマウスとCot/Tpl2 KOマウス由来のマクロファージを使って、LPSが誘導するケモカインの発現に対するMyD88とCot/Tpl2の役割について検討した。LPSに応答する9つのケモカインのうちccl (CC chemokine ligand) 5、cxcl (CXC chemokine ligand) 10とcxcl13はMyD88非依存的事に発現が誘導された。興味深い事に、Cot/Tpl2-ERKシグナルはこれら3つのケモカインの発現にネガティブに作用した。反対に、ccl2、ccl7、cxcl2、cxcl3、ccl8とcxcl9はMyD88依存的事に発現が誘導された。Cot/Tpl2-ERK経路はccl2、ccl7、cxcl2とcxcl3の発現を促進し、ccl8とcxcl9の発現は抑制した。LPSは様々な経路を介して多様なケモカインの発現を誘導している。

O-73

マウス LPS 誘導歯周炎における IL-33 の関与
 ○大野 建州¹、前川 祥吾^{1,2}、和泉 雄一²、東みゆき¹ (東医歯大 分子免疫、²東医歯大 歯周病)

【目的】 IL-1 ファミリーに属する新しいサイトカインとして同定された IL-33 は、Th2 型の免疫応答を惹起する。IL-33 は、抗原非存在下でも Th2 細胞やマスト細胞を活性化でき、最近では、新しく同定されたナチュラルヘルパー細胞などの自然リンパ球から大量の Th2 サイトカイン産生を誘導し、Th2 型の免疫応答誘導に関わるサイトカインとして注目されている。しかしながら、歯周病病態形成における IL-33 の役割は不明である。本研究では IL-33 の歯周病病態形成における役割を明らかにすることを目的とした。**【方法、結果、考察】** 野生型および IL-33 欠損マウスの上顎第一、第二大臼歯間歯肉にサルモネラ菌由来 LPS 20 ug を週 3 回 4 週間注射投与し、歯周炎を誘導した。最終投与から 1 週間後に歯槽骨吸収を評価した。IL-33 欠損マウスでは野生型マウスと比較して歯槽骨吸収が大きかった。また、同様 LPS を歯肉内に注射投与し 3 時間後の歯肉組織中の IL-1 β および IL-33 mRNA 発現を定量 PCR で解析した。IL-1 β および IL-33 mRNA 発現量は LPS 注射投与によって増大した。これらの結果から歯周炎誘導によって歯肉組織における IL-33 発現量が増大すること、また IL-33 欠損は歯槽骨吸収を増悪させることが示された。IL-33 は歯槽骨吸収などの歯周病病態形成に抑制的な役割をもっている可能性が示唆された。

O-75

マウス共存培養系における各種 TLR リガンド誘導性破骨細胞形成に対する抗菌ペプチド CRAMP の作用
 ○堀部 寛治¹、中道 裕子²、中村 美どり¹、高橋 直之²、宇田川 信之^{1,2} (松歯大 歯生化、²松歯大 総歯研)

【目的】 Cathelicidin は哺乳類において産生される抗菌ペプチドであり、マウス Cathelicidin は CRAMP (Cathelicidin-related antimicrobial peptide) と呼ばれる。CRAMP は殺菌作用に加え、TLR4 リガンドである LPS による様々な生理反応を抑制することが報告されている。そこで、我々は LPS をはじめとした TLR リガンドによる破骨細胞形成促進効果に対する CRAMP の作用を検討した。**【方法と結果】** マウス骨髄細胞・骨芽細胞共存培養系において TLR2/6 リガンド Pam2CSK4、TLR4 リガンド LPS が誘導する破骨細胞形成を CRAMP は抑制作用を示した。一方、各種骨吸収促進因子である 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ 、PGE $_2$ 、または PTH が誘導する破骨細胞形成に対し、CRAMP は影響を与えなかった。マウス骨髄マクロファージに TLR リガンドと CRAMP を同時添加し、24 時間後に TNF- α 産生量を ELISA 法にて解析した。LPS 誘導性 TNF- α 産生を CRAMP は抑制した。**【考察】** マウス骨髄細胞・骨芽細胞共存培養系における LPS、Pam2CSK4 誘導性破骨細胞形成を CRAMP は抑制したことから、CRAMP は歯周病をはじめ細菌感染により惹起される炎症性骨破壊に対して抑制効果がある可能性が示された。CRAMP は、LPS によるマクロファージにおける TNF- α 産生誘導を抑制したことから、LPS をはじめ他の TLR リガンドが誘導する様々な炎症性反応も CRAMP が抑制することが期待される。

O-74

ヒト歯肉線維芽細胞による lipid A 誘導 IL-6 および IL-8 産生における AmB の効果
 ○玉井 利代子¹、清浦 有祐¹ (羽野大 歯口腔病態解析制御)

【目的】 ヒト歯肉線維芽細胞の lipid A 誘導 IL-6 および IL-8 産生における AmB の効果を検討した。**【方法】** ヒト歯肉線維芽細胞を合成 lipid A (100 ng/ml) と AmB (0.4、1、2.5 μ g/ml) 添加または非添加の 10% FBS 含有 α -MEM で 24 時間培養後、上清を回収、IL-6 および IL-8 産生を ELISA 法で検討した。抑制実験では、合成 lipid A (100 ng/ml) と AmB (2.5 μ g/ml) 添加前に caspase-8 または caspase-1 抑制剤 (10 μ M または 25 μ M) を含む培地でヒト歯肉線維芽細胞を 1 時間前培養した。生細胞数は MTS 法で検討した。Caspase-8 と caspase-1 の活性化はフローサイトメトリーまたは比色法で調べた。NF- κ B p50 の活性化は ELISA 法で検討した。**【結果と考察】** AmB 単独では、ヒト歯肉線維芽細胞による IL-6 および IL-8 産生はみられなかった。しかしながら、AmB によってヒト歯肉線維芽細胞の lipid A 誘導 IL-6 および IL-8 産生は相乗的に増加した。NF- κ B 活性化においても同様の結果が得られた。メチル- β -シクロデキストリン含有培地で前培養によって、AmB による lipid A 誘導 IL-6 および IL-8 産生増加が抑制された。また、AmB は caspase-8 と caspase-1 の活性化を惹起した。一方、caspase-8 抑制剤は AmB によるヒト歯肉線維芽細胞の lipid A 誘導 IL-6 産生増加を部分的に抑制した。以上の結果は、AmB によるヒト歯肉線維芽細胞の lipid A 誘導 IL-6 産生増加における細胞膜コレステロールと caspase-8 活性化の関与を示唆する。

O-76

口腔扁平上皮癌患者末梢血のサイトカイン産生能と T 細胞亜集団
 ○長縄 鋼亮¹、高山 英次²、足立 誠³、飯田昌樹³、本橋 征之¹、光藤 健司³、村松 泰徳¹、式守 道夫¹、藤内 祝³、近藤 信夫² (朝日大 歯口腔外科、²朝日大 歯口腔生化、³横浜市大 医 顎顔面口腔機能制御)

【目的】 口腔癌の悪性度は原発巣の浸潤能や転移能のみならず、宿主の免疫能によっても影響を受けることが指摘されており、担癌患者の血漿中のサイトカイン濃度や末梢血中のリンパ球は癌の進行や癌患者の予後と相関することが報告されている。そこで今回われわれは、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 患者末梢血漿中サイトカイン、末梢血球サイトカイン産生能、さらに末梢血中リンパ球サブセットを解析し、OSCC の進行度との相関を検討したのでその概要を報告する。**【方法】** 未治療の OSCC 患者の末梢血を採取し、末梢血漿中の各種サイトカインを ELISA 法にて定量した。また in vitro で末梢血リンパ球を LPS 刺激培養し ELISA 法でサイトカイン産生能を測定した。さらにフローサイトメーターでリンパ球亜集団を解析した。**【結果】** OSCC 進行症例ではリンパ節転移に相関して IFN- γ 産生能が優位に増強した。一方腫瘍径の増大は末梢血中 CD4 + CD57 + T 細胞の比率の上昇と優位に相関していた。**【考察】** OSCC の悪性度は患者末梢血中リンパ球の IFN- γ 産生能や患者末梢血中 CD4 + CD57 + T 細胞の増加と関連することが示唆された。OSCC の悪性化に伴う進行症例における IFN- γ 産生能や CD4 + CD57 + T 細胞の調節機構や機能を検討することは、OSCC の新規臨床診断ツールとして有用であることが示唆された。

O-77

Low-Intensity Pulsed Ultra Sound (LIPUS) が炎症性遺伝子発現に及ぼす影響

○松口 徹也¹、楠山 譲二¹、坂東 健二郎¹、柿元 協子¹、大西 智和¹ (鹿大院医歯 口腔生)

【目的】 LIPUS (低出力超音波パルス) は骨芽細胞の分化促進作用が知られ、骨折治療に臨床応用されているが、炎症性疾患への効用は不明である。今回、炎症性骨疾患における LIPUS の臨床応用の可能性を探る目的で、LIPUS 照射による骨芽細胞、マクロファージの炎症性遺伝子 mRNA 発現レベル、および炎症性転写因子活性の変動を解析した。【方法】 マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 およびマクロファージ株 RAW264.7 に、LIPUS 照射 (7.5~120mW/cm²)、もしくは LIPUS 照射下での LPS 刺激 (0.1~1μg/ml) を加えた後に total RNA を回収し、定量 RT-PCR 法にて、各種ケモカイン、MMPs、および TIMPs の遺伝子発現レベルを解析した。また、両細胞株にルシフェラーゼレポータープラスミドを導入し、LIPUS 照射による各種転写因子活性の変動を解析した。【結果と考察】 LIPUS 照射により、MC3T3-E1 細胞の MMP2 の恒常的 mRNA 発現量は有意に低下したが、その inhibitor である TIMP2 の発現量に変化は見られなかった。同様に、MC3T3-E1 および RAW264.7 の LPS 刺激によるケモカイン (CXCL1, CCL10) の mRNA 発現レベルの上昇は LIPUS 照射により有意に抑制された。また、LIPUS 照射は、両細胞株における LPS 誘導性の NF-κB および AP-1 活性上昇を有意に抑制した。LIPUS は歯周病等による炎症性組織破壊に有効な可能性がある。

O-78

ケモカイン CXCL14/BRAK は癌細胞の肺転移を抑制する

○畑 隆一郎¹、居作 和人²、加藤 靖正³ (神歯大 歯 口腔難治、²神歯大 歯 生化学分子生物、³奥羽大 歯 口腔機能分子生物)

【目的】 我々は先に BRAK が種々の癌の進展抑制因子であることを報告した (Ozawa et al. BBRC, 2006, 2009a, b, Izukuri et al., 2010, Ito et al., 2010)。今回は BRAK が癌転移抑制に関与する否かについて調べた。【結果】 BRAK タンパク質を野生型マウス (Wt) の 10 倍発現するトランスジェニックマウス (Tg) の尾静脈より黒色腫細胞を注入すると、BRAK トランスジェニック (Tg) マウスでは肺転移したコロニー数が野生型 (Wt) マウスより有意に少なかった。抗アシアロ GM1 抗体あるいは抗 NK1.1 抗体により NK 細胞を除去すると、Wt、Tg マウスの肺転移コロニー数は激増したのでナチュラルキラー (NK) 細胞活性が転移抑制に関与していると考えられる。一方、Tet/On により BRAK を発現する黒色腫細胞を作成し、Wt, Tg, および T, B, NKT 細胞を欠損する SCID マウスに注入すると BRAK の発現により肺転移コロニー数が有意に低下した。NK 細胞を欠損した NOG マウスでは、BRAK 発現に拘わらず転移コロニー数が Wt マウスの 10 倍に上昇した。【結論】 CXCL14/BRAK 遺伝子を癌細胞、あるいは宿主マウスのどちらかに発現しても NK 細胞依存的に肺転移が抑制され、BRAK の発現が黒色腫の肺転移抑制に関与することが示された。

O-79

Streptococcus mutans の GlmS と NagB は糖代謝調節因子であり、病原性発現に影響を与える

○松尾 (川田) 美樹¹、於保 孝彦²、小松澤 均¹ (鹿大院医歯 口腔微生物、²鹿大院医歯 予防歯科)

細菌内に輸送された糖は、解糖系によるエネルギー産生や細胞壁のペプチドグリカン産生に用いられ、生命維持に重要な役割を果たしている。本研究では、う蝕原性菌 *Streptococcus mutans* の菌体内糖代謝機構解明を目的とし、糖代謝関連因子の機能解析を行った。遺伝子発現解析から、化学合成培地 (CDM) にグルコース (Glc) のみを添加した際、*nagB* 発現抑制と *glmS* 発現誘導が認められた。一方、CDM にアミノ糖の一つである N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を添加した培地では、*nagB* 発現が誘導され、*glmS* 発現が抑制された。*glmS* 欠損株、*nagB* 欠損株を用いて、糖とアミノ糖における生育の違いを検証した結果、*glmS* 欠損株は Glc のみの培地では生育できず、GlcNAc 存在下においてのみ生育可能であること、反対に *nagB* 欠損株は Glc のみの培地でのみ生育可能であるが、GlcNAc 存在下では生育が抑制された。菌体内に取り込まれた糖もしくはアミノ糖は、GlmS, NagB による逆方向性の代謝調節を受け、解糖系と細胞壁合成系に分配されていることが示唆された。さらに *glmS* 欠損株ならびに *nagB* 欠損株では、バイオフィーム関連遺伝子発現の変化が認められた。本研究から、*S. mutans* の GlmS と NagB が糖のスムーズな分配を可能にすることで、菌体の生命維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、本因子は *S. mutans* の病原性因子であるバイオフィーム形成能への関与も明らかになった。

O-80

口腔膿瘍から分離した *Streptococcus intermedius* のゲノム解析

○山根 一芳¹、南部 隆之¹、真下 千穂¹、山中 武志¹、福島 久典¹ (大歯大 細菌)

【目的】 根尖部に残存する細菌は、根尖性歯周炎の難治化に関与することが示唆されている。我々は難治性の根尖病巣や根尖膿瘍内にバイオフィーム構造をもつ菌株が存在し、これらの菌株が形成するバイオフィームが病巣での細菌残存因子になっていることを報告してきた。本研究では口腔細菌のバイオフィーム形成関連遺伝子を明らかにすることを目的に、口腔膿瘍から分離した *Streptococcus intermedius* H39 株のゲノムを解析した。

【方法】 H39 株のゲノム DNA からライブラリーを作成し、GS Junior System を用いてパイロシーケンスした。得られたデータをアセンブルし、contig を構築した。Contig 内の塩基配列から CDSs を予測し、データベース上で相同性の高い配列を検索した。

【結果と考察】 ゲノム遺伝子をパイロシーケンス法で解析した結果、15.0 の冗長度で配列が得られ、44 の contig を構築できた。遺伝子予測の結果、これらの contig 内に 1953 の CDSs が予測された。BLAST 解析の結果、バイオフィームの構成要素である多糖の合成経路や、他の菌株で多糖の分泌輸送への関与が示唆されている遺伝子と相同性の高い CDS の存在が明らかになり、これらの遺伝子群がバイオフィーム形成に関与していることが予測された。本研究には科学研究費補助金 基盤研究 (C) (23592724)、若手研究 (B) (24791975、23792118) の助成を受けた。

O-81

菌面初期定着菌群との共培養時における *Streptococcus mutans* 抗酸化タンパク質の機能解析

○安永 愛¹、吉田 明弘¹、西原 達次²、安細 敏弘¹ (¹九歯大 歯 フロンティア、²九歯大 歯 感染分子)

【目的】 歯細菌 *Streptococcus mutans* が菌面でバイオフィルムを形成する際、最初に菌面に付着した初期定着菌と凝集する事が知られている。これまで、我々は *Streptococcus gordonii* と共培養した際に *S. mutans* に発現上昇するタンパク質の1つが抗酸化因子である Dpr であることを報告してきた。本研究では、*S. mutans* の初期バイオフィルム形成機構について解析する目的で、*S. gordonii* など初期定着菌群の *S. mutans* 抗酸化ストレス遺伝子欠失株への影響を検討した。【方法】 *S. gordonii* による *S. mutans* 抗酸化ストレス遺伝子欠失株への影響は、寒天培地を用いた阻害実験にて解析した。また、*S. gordonii* 過酸化水素産生遺伝子欠失株や、その他の初期定着菌である *S. oralis*、*S. mitis*、*S. sanguinis*、*A. naeslundii* についても同様に解析を行った。【結果】 *S. mutans* 抗酸化ストレス遺伝子欠失株に対する *S. gordonii* による生育阻害実験の結果、3つの抗酸化ストレス遺伝子欠失株のうち、*dpr* 遺伝子欠失株のみに生育阻害が確認された。また、*S. gordonii* 過酸化水素産生遺伝子欠失株では生育阻害は認められず、*S. mitis*、*S. sanguinis* による *dpr* 遺伝子欠失株への生育阻害が確認された。【考察】 これらの結果から、*S. mutans* Dpr が、*S. gordonii* 等いくつかの初期定着菌との競合において、必須のタンパク質である可能性が示唆された。

O-83

可動性因子が生み出す *Porphyromonas gingivalis* 種内多様性機構の解明

○渡辺 孝康¹、野澤 孝志¹、相川 知宏¹、遠藤 亜希子²、丸山 史人¹、中川 一路¹ (¹東医歯大 細菌感染制御、²東医歯大 歯周病)

Porphyromonas gingivalis は、糖尿病など全身疾患への関与も指摘される、临床上重要な歯周病原性細菌である。これまでに我々の研究において、重度歯周病患者から分離された *P. gingivalis* TDC60 株の全ゲノム配列を決定し、ゲノム解析を行った結果、多数存在する可動性因子が本菌の多様性を生じさせているものと考えられた。そこで、国内臨床分離株 44 株を含む計 60 株において、パルスフィールドゲル電気泳動法と multilocus sequence typing 法で解析した。この結果、いずれも高い遺伝的多様性を示したことから、本菌の種内多様性の高さには可動性因子のゲノム内移動とこれらを介したゲノム再構成が関与していると考えられた。

今回、本菌の種内多様性創出機序の解明を目的として、ゲノム解析により同定された clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) の配列多様性を 60 株で解析した。その結果、TDC60 株の保有する 4 種類の CRISPRs の保有の有無や、CRISPR の配列構造の一部であるスペーサー配列の個数などが、株間で大きく異なることがわかった。さらに、スペーサー配列の解析から、CRISPR による可動性因子の移動制御の可能性が示されたので、本発表において報告したい。

O-82

Porphyromonas gingivalis ジンジパインによるヒト歯肉上皮細胞の interleukin-33 発現誘導

○多田 浩之¹、島内 英俊²、松下 健二¹ (¹国立長寿医療研究センター 口腔疾患、²東北大学 歯内歯周)

【緒言】 粘膜組織において、上皮細胞は細菌、アレルゲンや寄生虫に対して物理的バリアとして機能するだけでなく、これらの刺激に応答して IL-33 を生産する。IL-33 はネクローシスにより細胞外に放出され、肥満細胞や好塩基球などを刺激することにより炎症の誘導に係わる。本研究は *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) に発現するシステインプロテアーゼ(ジンジパイン)により、歯肉上皮細胞から IL-33 が誘導される可能性について検討した。【方法】 ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 を *P. g* W83、ATCC33277、ジンジパイン変異株 KDP136 の凍結乾燥全菌体、*P. g* 381 fimbriae、*P. g* 合成リポペプチドないし *P. g* LPS で刺激した。刺激後の細胞における IL-33 mRNA 発現量は定量性 RT-PCR 法にて、細胞内 IL-33 蛋白発現はウェスタンブロット法および免疫染色法にて測定した。【結果と考察】 1. Ca9-22 細胞を *P. g* 全菌体で刺激すると、IL-33 mRNA 発現および細胞内 IL-33 タンパク発現が亢進された。2. 同 IL-33 誘導作用は、fimbriae、PGTP-2 および *P. g* LPS ではみられなかった。3. 同細胞をジンジパイン阻害剤で前処理した全菌体もしくは KDP136 全菌体で刺激すると、IL-33 mRNA 発現誘導は有意に減少した。4. *P. g* 全菌体による IL-33 mRNA 発現誘導は、PAR2 siRNA 導入細胞もしくは MAP キナーゼ p38 前処理細胞において有意に減少した。以上の結果から、IL-33 が歯周炎の病態形成に関与する可能性が示唆された。

O-84

Porphyromonas gingivalis における Por 分泌機構依存性分泌プロテアーゼの解析

○野中 美那子¹、庄子 幹郎¹、雪竹 英治¹、門脇 知子¹、佐藤 啓子¹、内藤 真理子¹、中山 浩次¹ (¹長大 院医歯薬 口腔病原微生物)

口腔偏性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は、慢性歯周炎の発症・増悪に関わる最重要細菌で、高いタンパク質分解活性を有することで知られている。これまで、私達はゲノム情報を利用した網羅的解析から、本菌が既知の分泌機構と異なる分泌機構(Por 分泌機構)を有することを報告した。*P. gingivalis* が菌体表面及び菌体外へ産生する強力なプロテアーゼであるジンジパイン(Rgp 及び Kgp)は、産生されるプロテアーゼの中でも主要なもので、Por 分泌機構により分泌される。Por 分泌機構構成タンパク質欠損変異株と Por 分泌機構保存株の培養上清を比較・検討した解析から、ジンジパイン以外に Por 分泌機構により分泌されるいくつかのタンパク質を同定した。その中に PGN_1416 タンパク質が含まれていた。ゲノム解析より PGN_1416 はリジルエンドペプチダーゼであることが推測されている。しかし、その詳細は不明であった。本研究では、PGN_1416 について、菌体における局在及び酵素活性(基質特異性、至適 pH 等)を検討した。その結果、PGN_1416 を含む分画は、カゼイン、ゼラチンを基質とするタンパク質分解活性を示した。さらに、合成基質での実験からリジン残基及びアルギニン残基の C 末端を切断する活性があることがわかった。また、その至適 pH はそれぞれの基質により異なることが示唆された。

O-85

細菌-ウイルス間相互作用による歯周病発症の可能性

○今井 健一¹、落合 邦康¹ (¹日大 歯 細菌)

Epstein-Barr ウイルス (EBV) はヒトを宿主とし、成人の 90% 以上に不顕性感染している。唾液を介して口腔咽頭上皮に感染した後増殖し、近傍の B 細胞に感染しすばやく潜伏感染状態となる。ウイルスと宿主の共存関係が破綻すると、EBV 再活性化や感染細胞の異常増殖がおこり伝染性単核球症や上咽頭がんなどが発症する。近年、EBV と歯周病および根尖性歯周炎との関連性を示す興味深い臨床研究データが報告されている。

(1) 歯周ポケットや根尖病巣から検出される EBV 量と病気の進行度が相関する。(2) 病巣の EBV 量と細菌量が相関関係にある。(3) 抗ウイルス薬の投与により病状が軽減する。しかしながら、口腔内で潜伏感染 EBV がどのように再活性化されるのか、さらには EBV がどのように歯周疾患の発症に関与しているのかについては不明である。我々は、細菌とウイルスの微生物間相互作用に着目し研究を行った結果、歯周病原菌が酪酸を介して潜伏 EBV を再活性化し、同時に放出されるウイルス因子が TLR/NF- κ B 経路を介して炎症性サイトカインの産生を誘導する事を見出した。

以上の結果は、細菌感染症と考えられてきた歯周疾患をウイルス感染症としても見直す必要性を示唆している。EBV が periodontopathic virus となりうるのか、研究を進めている。更に、歯周病研究を通して、EBV が関連する慢性関節リウマチや潰瘍性大腸炎などの炎症疾患の分子基盤が明らかになることが期待される。

O-87

ワイヤー法による *Streptococcus-Veillonella* 属菌種のバイオフィルム形成とその定量

○眞島 いづみ¹、鎌口 有秀¹、宮川 博史¹、藤田 真理¹、中澤 太¹ (¹北医大 歯 微生物)

【背景】口腔 *Veillonella* 属は口腔バイオフィルムを構成する主たる早期定着菌として形成初期から多く存在し、現在、*V. atypica*、*V. denticariosi*、*V. dispar*、*V. parvula*、*V. rogosae*、*V. tobetsuensis* の 6 菌種が分離同定されている。しかし、口腔 *Veillonella* 属菌種レベルのバイオフィルム形成能の詳細は未だに明らかになっていない。【目的】*Streptococcus gordonii*、*S. mutans*、*S. salivarius* と口腔 *Veillonella* 6 菌種のバイオフィルム形成能を解析する。【材料と方法】上記口腔 *Veillonella* 属 6 菌種と *S. gordonii*、*S. mutans*、*S. salivarius* の代表的菌株を、人口唾液により処理した直径 0.9 mm のワイヤーを挿入した試験管に各 1 菌種のみ、2 菌種の全ての組み合わせで菌液を播種し、37°C、嫌気条件下で培養した。バイオフィルムの形成を確認後、全 DNA を抽出し、定量的 real-time PCR によりワイヤー表面に形成されたバイオフィルムの構成菌種を定量した。【結果と考察】*Streptococcus* 属単独よりも、各口腔 *Veillonella* 属細菌と共培養することにより、バイオフィルム形成量は明らかに増加した。またそのバイオフィルム形成量も *Veillonella* 属細菌種により大きく異なった。これらの結果より、口腔バイオフィルム形成初期段階において、口腔 *Veillonella* 属は菌種レベルでその役割が異なる可能性が示唆された。

O-86

S46 ファミリーペプチダーゼ (DPP7/DPP11) の分類と DPP11 サブタイプの同定

○根本 孝幸¹、Rouf SM Abdur¹、小野 俊雄¹、下山 佑²、木村 重信²、根本 優子¹ (¹長大院 歯 口腔分子生化学、²岩医大 分子微生物)

【目的】*Porphyromonas gingivalis* が Asp/Glu 特異的新規 DPP11 を発現することが明らかになり、S46 ファミリーは S46.001/DPP7 と S46.002/DPP11 で構成されることが判明した。しかし現在のところクラスタ解析による同ファミリー 264 分子の分類は完全ではない。本研究では DPP7 と DPP11 の基質特異性を決定するアミノ酸残基を同定し、当該残基による S46 ファミリーの再分類を行った。【方法】*Bacteroidetes* 門で発現する同ファミリー分子は 5 つのクラスタに分類されるが、各クラスタの代表分子を大腸菌で発現し、それらの基質特異性を決定した。さらに *in vitro* 変異により基質特異性に関与するアミノ酸残基について詳細に検討した。【結果】リコンビナント DPP 群の解析から Gly⁶⁷³ は DPP7 の、Arg⁶⁷³ は DPP11 基質特異性を示すことが判明した。これらの残基を相互置換することにより基質特異性が部分的に転換した。以上の結果に基づき 673 番目のアミノ酸で再分類すると、NJ 法では誤って分類されていた分子や、未決着のメンバーを DPP7 あるいは DPP11 と決定できた。*Shewanella* 属など 30 のメンバーは例外的に Ser⁶⁷³ を有し、これらは DPP11 の基質特異性を示すものの、Arg⁶⁷³ タイプ DPP11 (Asp>Glu) とは異なり Glu 指向性であることが判明した。【結論】673 番アミノ酸に基づく DPP7 と DPP11 分子の判別法を確立した。DPP11 には Arg⁶⁷³ を有し Asp>Glu 指向性を示す型と Ser⁶⁷³ で Glu>Asp 指向性を示す 2 型が存在する。

O-88

歯周病原性細菌はマクロファージにおける pyroptosis を誘導する

○沖永 敏則¹、有吉 渉¹、西原 達次¹ (¹九歯大 感染分子)

【目的】現在まで我々は、歯周病原性細菌感染マクロファージにおいて、細胞周期停止の誘導、さらに関連遺伝子やタンパクの発現を分子生物学的解析により明らかにしてきた。今回、歯周病原性細菌感染マクロファージにて、炎症反応と pyroptosis の観点から分析したところ興味深い知見が得られた。【方法】ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞と歯周病原性細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 株ならびに ATCC29522 株を使用し、我々が構築した実験系にて感染実験を行った。細胞周期解析はフローサイトメータにて、タンパク発現についてはウェスタンブロットティング、遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR にて、サイトカイン産生については ELISA 法にて解析を行った。【結果】THP-1 細胞のファゴサイトーシス能について *A. actinomycetemcomitans* GFP 発現株を使用し蛍光顕微鏡にて確認した。FACS 解析にて、*A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージにおいて subG1 期での細胞割合の上昇を認めた。また、*IL-1 β* 遺伝子の著明な発現亢進と *IL-1 β* の産生が明らかになった。さらに、インフラマソーム関連タンパクである NALP3 (NLRP3) と caspase-1 ならびに ASC の発現が認められた。以上から、歯周病原性細菌感染マクロファージにおいて、インフラマソーム活性化とサイトカイン *IL-1 β* の産生により pyroptosis が誘導されることが示唆された。

O-89

比較ゲノム解析により見えた *Tannerella forsythia* の生存戦略

○遠藤 亜希子¹、渡辺 孝康²、細見 晋吾²、野澤 孝志²、相川 知宏²、荒川 真一¹、梅田 誠³、丸山 史人²、和泉 雄一¹、中川 一路² (¹東医歯大 歯周病、²東医歯大 細菌感染制御、³大歯大 歯周病)

Tannerella forsythia は、歯周病に最も関連する口腔内細菌の一つと考えられているが、病態との関連は明らかではない。この原因として、本菌の個々の病原性遺伝子に着目した研究は行われているが、俯瞰的な視点からの研究に必須となるゲノム情報が、実験株由来である ATCC 株のものしか存在しないことが考えられる。そこで本研究では、異なる歯周病態を示す患者から分離した *T. forsythia* 20 株のゲノム情報を基にし、本菌と歯周病の関連性を見出すことを目的とした。

まず、単離株のゲノム配列情報をイルミナ社 GAIIX により取得した (470~1,000 Mbp)。配列のアセンブル、遺伝子予測、機能推定を行い、1 株あたり平均 4,000 の遺伝子を見出した。そして多様性解析のために、一塩基多型 (SNP) 解析と細菌の獲得免疫機構である clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) の解析を行った。SNP 解析の結果、分離株間で遺伝子の配列多様性が認められ、SNP に基づく系統樹を作成した結果、系統的に近い株でも歯周病態が異なることが確認された。また、CRISPR 解析の結果、18 株で 1 種あるいは 2 種の CRISPR が見つかり、そのリピート数やスペーサー配列は株間で大きく異なっていた。さらに、スペーサー配列の解析の結果から *T. forsythia* の歯周ポケットにおける生存戦略が見えてきたので、新たな知見について紹介したい。

O-91

マウス舌発生における舌筋前駆細胞の移住は舌下神経の軸索誘導に働く

○田谷 雄二¹、島津 徳人¹、佐藤 かおり¹、藤田 和也¹、添野 雄一¹、青葉 孝昭¹ (¹日歯大 生命歯 病理)

【目的】 舌下神経軸索は神経細胞の移住経路を辿る他の脳神経軸索とは異なり、後頭神経根を起始し複数の鰓弓を経て舌原基に至る長距離を伸長する。本研究では、マウス胎仔鰓弓領域における舌筋前駆細胞と舌下神経軸索の相互位置関係を検証することにより、舌筋前駆細胞と舌下神経の軸索誘導の関連について検討した。【方法】 ICR マウス胎仔 (胎生 9.5~11.5 日) から連続薄切切片を作製し、神経軸索 (PGP9.5/GAP43)・筋系譜細胞 (Desmin) に対する特異抗体による免疫二重染色を施し、組織空間における神経軸索と舌筋前駆細胞集団の局在を同定した。同発生時期の下顎突起試料の DNA マイクロアレイデータに基づき、神経分化・突起形成・軸索ガイダンスに関わる遺伝子発現を解析した。【結果と考察】 後頭体節に由来する舌筋前駆細胞集団は胎生 9.5 日後後に移住を開始し、体幹間充織側方部→第 2-4 鰓弓側方部を経由して、その先頭集団は胎生 10.5 日の下顎突起正中部に到達する。後頭神経核から起始する舌下神経軸索は胎生 10.5 日に伸長を始め、舌筋前駆細胞の移住経路を辿り、胎生 11.5 日に下顎突起の舌原基直下に到達する。伸長途上にある神経軸索は筋系譜細胞に囲まれており、胎生 11.5 日の舌原基直下で舌下神経の軸索先端部が細かく分枝する時期に合致して、神経-筋接合に関連する遺伝子発現の上昇をとまうことが注目された。

O-90

Candida から発見した NAD アナログの神経細胞分化誘導に関する研究

○上西 秀則¹、長 環¹、今吉 理恵子¹、永尾 潤一¹ (¹福歯大 機能生物化学 感染生物)

【目的】 *Candida* の菌体から分化誘導能を有する物質が存在することを発見したので、その組成分析と構造解析の結果に基づいて物質を化学合成した。菌由来の物質は NAD 類似体 (NAD のニコチン酸に L-リボースが結合: L-RibNAD と略) である。今回は L-RibNAD の神経突起伸長作用を解析することを目的として試験を行った。【方法・結果】 1) ラット胎児脳神経細胞に対する効果: L-RibNAD の添加量 (0.01~1 μ g/ml) に比例して神経突起が対照よりも約 1.5 倍の長さへ伸長することが観察された。また、神経突起の分岐数も増加し、伸長した神経突起の表面には多数の varicosity が形成されることも観察された。2) ヒト由来神経芽腫細胞 (NB-1) に対する効果: NB-1 を飢餓環境で培養し、L-RibNAD による神経突起の伸長効果を調べた。この結果、L-RibNAD を 0.5~1 μ g/ml 添加すると、神経突起は顕著に伸長し、神経突起によるネットワークが形成されることが観察された。また、L-RibNAD 添加例では細胞の生存日数が約 1.7 倍延長されることも確認された。3) 遺伝子発現解析: ラット胎児脳神経細胞および NB-1 に L-RibNAD を添加して培養し、2~4 日後に RNA を抽出。マイクロアレイ解析を行った。この結果、いずれの細胞においても Nervous System Development and Function に関与する一連の遺伝子群が有意に発現することを認めた。【考察】 以上の成績は L-RibNAD が神経疾患治療薬としてのポテンシャルを有していることを示唆する。

O-92

Effects of p53-reactivating compounds Nutlin-3 and RITA on p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation

○池田 正明¹ (¹東医歯大 歯 歯 分子発生)

The activity of p53 tumor suppressor protein is impaired in most oral squamous cell carcinoma (SCC). Restoration of wild-type p53 (wt-p53) function by its gene transfer or by p53-reactivating compounds, such as Nutlin-3 and RITA, has been extensively investigated. Nutlin-3 and RITA activate p53 without genotoxic stress by antagonizing the action of p53 negative regulator Mdm2. Here we examined whether Nutlin-3 and RITA can overcome resistance to p53-mediated apoptosis in p53-resistant oral SCC cells lacking the ability to phosphorylate p53 at Ser46 (p53Ser46), which is crucial for p53-mediated apoptosis. We show that Nutlin-3 did not rescue the apoptotic defect of a Ser46 phosphorylation-defective p53 mutant in p53-sensitive tumor cells. Furthermore, treatment of Nutlin-3 or RITA, together with adenoviral p53 gene transfer, failed to induce apoptosis in p53Ser46 phosphorylation-deficient cells lacking wt-p53. These results indicate that Nutlin-3 and RITA are unable to induce p53-mediated apoptosis in the absence of p53Ser46 phosphorylation. Thus, the dysregulation of p53Ser46 phosphorylation may be a critical factor that limits the efficacy of these p53-based cancer therapies.

O-93

マウス咬筋の成長発育期における tenomodulin の発現について

○佐藤 巖¹、三輪 容子¹、財前 知則¹、春原 正隆¹ (1日歯大 生命歯 解剖1)

【目的】筋線維の分化は胎生期にすでに起こり、生後には筋線維タイプに反映された発達・分化が進むと考えられている。このうち骨格筋は胎生期に分化するが咀嚼筋の筋タイプ分化は生後に食性の変化により起こるとされている。我々は以前、筋分化抑制因子であるミオスタチンに着目し、生後の骨格筋と咀嚼筋における発現量を比較しミオスタチンが骨格筋では生後直後から減少しているのに対し、咀嚼筋では5日程度遅れて生後10日から減少したことから咀嚼筋の分化遅延がミオスタチンによって制御されている可能性を報告してきた。しかし筋の発達に不可欠な血管網の増大や筋内部に含まれる細胞外マトリックスの関係についてはよく知られていない。【方法】本研究では血管新生と分化を抑制することで腱・靭帯の形成や再生に関与する新規マーカーであるII型の膜貫通型糖タンパク質 tenomodulin の発現に着目し、出生前後のマウスの骨格筋と咀嚼筋における発現動態を検討した。リアルタイムPCR法を用いてそれぞれの筋組織中の tenomodulin の mRNA レベル発現量を比較した。【結果と考察】咀嚼筋が他の骨格筋とは異なる発現パターンを示し、さらに血管新生マーカーである VEGF とは逆の発現傾向を示したことから、咀嚼筋の筋タンパクと血管供給の増大にはこの因子が関与する可能性を示唆した。

P1-1

新しい天然成分による口腔微生物発育抑制効果

○松生 理恵子¹、田村 宗明^{2,3}、落合 邦康^{2,3} (1日歯大 歯、2日歯大 歯 細菌、3日歯大 総歯研 生体防御)

【目的】日常的な口腔ケアの欠如は、口腔内の微生物バランスを崩し、様々な感染症を惹き起こす。常在微生物の増加と遷移は、口腔疾患の原因となるばかりでなく、様々な全身性疾患の一因となることが報告されている。近年、高齢者増加に伴い、正常な口腔衛生環境の維持は極めて重要な問題である。我々は、これまで口腔ケアを目的にカテキンジェルを開発し、臨床治験を含め、良好な抗菌効果を確認した。今回、より効果的な口腔ケア剤の開発を目的に新たな天然成分を検索し、その抗菌活性について検討した。【方法】被験菌は口腔微生物10株、抗菌活性が期待できる天然成分は15種類を供試した。発育阻止効果は改良型寒天拡散法で評価し、良好な抗菌効果を示した成分について高齢者ならびに義歯装着者から検出率が高い *Candida albicans* に対する発育および菌糸形変換抑制効果を検討した。また、菌糸形変換に関連する遺伝子発現への影響を Real Time PCR で測定した。【結果と考察】供試成分のうち、黄金エキスパウダーならびにアリルイソチオシアネートが良好な抗菌効果を示し、これらの成分はレジジン付着 *C. albicans* の発育を顕著に阻害した。低濃度で菌糸形変換を抑制するとともに、変換関与の特異的な遺伝子発現も抑制した。以上の結果から、これらの天然成分は口腔ケアに使用できる可能性が示唆された。(会員外協力者：一丸ファルコス株式会社・田中清隆)

P1-2

Dmu マウスにおける骨格筋及び運動ニューロンの変性

○藤田 雅俊¹、佐藤 匡¹、狩野 充浩¹、清水 良央²、金高 弘恭³、鈴木 敏彦¹、市川 博之¹ (1東北歯大 口腔器官構造、2東北歯大 口腔病理、3東北歯大 イノベーションリエゾンセ)

Degenerating Muscle Mouse (Scn8admu)は、生後11日から後肢の運動異常を示し、生後1カ月までに心筋の変性により死に至る。このマウスにおいては、Na channelの一つである Scn8a の遺伝子発現が低下していることが知られているが、その原因遺伝子は明らかではない。本研究では、まず dmu マウスにおける頭部と後肢の筋肉の変性について比較した。wild type 及び dmu マウスの咬筋と腓腹筋に hematoxylin-eosin 染色を行った結果、dmu マウスの腓腹筋においては、筋線維の萎縮に伴い、細胞核の密度の増加が観察された。一方、咬筋における細胞核の密度には変化がなかった。さらに脊髄における神経細胞の変性或いは細胞死を調べるために c-Jun、calcitonin gene-related peptide (CGRP)、ATF-3、caspase-3 及びアストロサイト応答を調べるために glial fibrillary acidic protein の分布を免疫組織学的に調べた。dmu マウスの脊髄前角においては、c-Jun と CGRP を発現する運動ニューロンが増加していた。これらの運動ニューロンの周囲には、多くのアストロサイトが増加、集積していた。しかしながら、ATF-3 や caspase-3 の分布には変化が認められなかった。以上の結果から、dmu マウスにおける頭部と後肢の筋では変性の程度に差があることが示唆された。また脊髄においては運動ニューロンに変性が生じ、その変性に対してアストロサイトが応答している可能性も示唆された。

P1-3

Hemokinin 1 は substance P の骨芽細胞骨形成促進作用を抑制する

○小早川 美輝¹、牧角 有華¹、小林 繁²、後藤 哲哉² (1九歯大 学生、2九歯大 頭頸部構造解析)

【目的】ヘモキニン1 (HK-1) は、TAC4によりコードされた新規タキキニンファミリー分子のひとつであり、ニューロキニン1 (NK-1) 受容体をサブスタンス (SP) と共有する。SP は骨芽細胞骨形成を促進するが、HK-1 の骨代謝に対する役割はわかっていないため、HK-1 の末梢における局在と骨芽細胞骨形成に対する役割を調べた。【方法】ラットの臼歯部に5日間矯正力を加えた後、歯周組織の免疫染色を行った。また、初代培養ラット骨芽細胞を用いて NK-1 受容体と TAC4 mRNA の発現を調べるとともに、骨芽細胞の骨形成に対する HK-1 の影響を調べた。【結果と考察】歯周組織においては神経線維、血管内皮細胞、および圧迫側の骨細胞で HK-1 の局在が認められた。RT-PCR法により、ラット骨芽細胞が NK-1 受容体と TAC4 mRNA を発現したことを認めた。また、培養液に HK-1 を添加した結果、HK-1 は濃度依存的に骨形成を抑制した。さらに、SP と HK-1 を同時添加すると HK-1 は SP の作用を競合的に抑制した。したがって、HK-1 は末梢組織において SP の骨芽細胞の骨形成促進作用に対する競合的な抑制作用を持つことが示唆された。