

プログラム



JAOB JAPANESE ASSOCIATION FOR
ORAL BIOLOGY since 1958

ロツテ基金特別講演 (PL-1)

ロツテ基金特別シンポジウム (FS-1~FS-3)

ライオン学術賞受賞講演 (L-1)

歯科基礎医学会学会奨励賞受賞講演 (Y-1~Y-4)

歯科基礎医学会学術シンポジウム (KS-1~KS-5)

日本学術会議シンポジウム (CS-1~CS-5)

メインシンポジウム (MSA-1~MSD-4)

ランチョンセミナー (LS-1~LS-3)

サテライトシンポジウム (SS1~SS16)

一般演題 (口演)

一般演題 (ポスター)

■ ロッテ基金特別講演（市民公開講座）

Plenary lecture accorded by the LOTTE Foundation

PL-1 岡野 栄之
(慶應大 医 生理)

「iPS 細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた未来の医療の開発」

座長：田隈 泰信（第 58 回歯科基礎医学会学術大会 大会長）

日時：8 月 25 日（木）13：00～14：00

会場：A 会場

■ ロッテ基金特別シンポジウム

Special symposium accorded by
the LOTTE Foundation

「遺伝子を標的とした未来の医療」

座長：田隈 泰信（第 58 回歯科基礎医学会学術大会 大会長）

日時：8 月 25 日（木）14：10～16：10

会場：A 会場

FS-1 The maturation of gene therapy: oral and general applications now and on the horizon

Bruce J. BAUM (Natl Inst Dent Craniofac Res)

FS-2 臓器線維症に対する VA-liposome HSP47 を用いた治療法の開発

新津洋司郎（北大 フード&メディカルイノベーションセ 分子標的探索研究）

FS-3 ゲノム編集による遺伝子改変の最前線

佐久間哲史（広大院理 数理分子生命理学）

■ ライオン学術賞受賞講演

L-1 阪井 丘芳

(阪大 院歯 顎治)

「遺伝子データベースを応用した器官形成機構の解明」

座長：西原 達次 (九歯大 感染分子生物)

日時：8月25日 (木) 11:10~12:00

会場：A 会場

■ 歯科基礎医学会学術奨励賞受賞講演

平成 28 年度 (第 28 回) 歯科基礎医学会学術奨励賞

日時：8月26日 (金) 11:00~12:00

会場：A 会場

【薬理学部門】座長：山崎 純 (福歯大 分子機能制御)

Y-1：平居 貴生 (愛院大 歯 薬理)

「骨代謝における時計遺伝子の関与」

受賞対象論文： β -adrenergic receptor signaling regulates PTGS2 by driving circadian gene expression in osteoblasts. Journal of Cell Science 127 (17) 巻 3711 頁~3719 頁 (2014 年発行)

【生化学部門】座長：上條竜太郎 (昭大 歯 口腔生化)

Y-2：藤本 舞 (明海大 歯 形態機能成育 歯科矯正)

「進行性骨化性線維異形成症から同定された ALK2 変異体は II 型受容体に対する感受性が異なる」

受賞対象論文：Mutant activin receptor-like kinase 2 in fibrodysplasia ossificans progressiva are activated via T203 by BMP type II receptors. Molecular Endocrinology 29 巻 140 頁~152 頁 (2015 年発行)

【生理学部門】座長：井上 富雄（昭大 歯 口腔生理）

Y-3：實松 敬介（九大 院歯 口腔常態制御 口腔機能解析）

「甘味受容体 TAS1R2/TAS1R3 におけるギムネマ酸の甘味抑制効果の分子メカニズム」

受賞対象論文：Molecular mechanisms for sweet-suppressing effect of gymnemic acids. The Journal of Biological Chemistry 289 巻 25711 頁～25720 頁（2014 年発行）

【微生物学部門】座長：川端 重忠（阪大 院歯 口腔細菌）

Y-4：中山 真彰（岡大 院医歯薬 口腔微生物）

「ポルフィロモナス・ジンジバリスが産生するジンジパインによる PI3 キナーゼ/Akt 経路抑制の分子機序」

受賞対象論文：Attenuation of the P13 kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp. The Journal of Biological Chemistry 290 巻 5190 頁～5202 頁（2015 年発行）

■ 歯科基礎医学会学術シンポジウム Symposium of JAOB

「組織再生に関わる基礎研究基盤の現状」

オーガナイザー：福本 敏（東北大 院歯 小児発達歯）

齊藤 正人（北医療大 歯 小児歯）

日時：8 月 25 日（木）9：00～11：00

会場：A 会場

KS-1 エピプロフィン は 歯 原 性 上 皮 細 胞 の エ ナ メ ル 芽 細 胞 系 へ の 誘 導 と 分 化 を 制 御 する多機能制御因子である

山田 吉彦¹, 酒井 陽^{1,2}, 千葉 雄太^{1,5}, Darius Mahboubi¹, 池内 友子¹, 石河 真幸^{1,3}, 中村 卓史⁴, 福本 敏⁵

(¹Lab of Cell and Dev Biol, NIDCR, NIH, ²名大 院医 頭頸部感覚器外科 顎顔面外科, ³東北大 院歯 口腔修復 歯科保存, ⁴東北大 院歯 口腔生物 歯科薬理 薬, ⁵東北大 院歯 口腔保健発育 小児発達歯)

KS-2 マトリックスペプチドを用いた組織再生誘導法の開発

野水 基義, 片桐 文彦, 保住建太郎, 吉川 大和（東京薬大 薬 病態生 化）

- KS-3 成体神経新生における老化と細胞外マトリックスの変化
平澤 恵理, Aurelierien Kerever, 山田 泰平 (順天堂大 院医 老人性疾患病態・治療研究セ)
- KS-4 幹細胞をターゲットとした唾液腺再生治療の開発
阪井 丘芳 (阪大 院歯 顎治)
- KS-5 脂質代謝における SCF^{β-TRCP} ユビキチンリガーゼ複合体の役割
犬塚 博之¹, 福島 秀文¹, 清水 康平², Wenyi Wei², 福本 敏¹
(¹東北大 院歯 先端再生医学研究セ, ²Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA)

■ 日本学術会議シンポジウム

Symposium of Science Council of Japan

「歯学研究における基礎と臨床のシグナル伝達」

座 長：小笠原康悦 (東北大 加齢医学研, 日本学術会議連携会員)
吉田 篤 (阪大 院歯 高次脳口腔機能)

日 時：8月26日 (金) 9:00~11:00

会 場：A 会場

- CS-1 歯学研究における基礎と臨床のシグナル伝達
山口 朗 (東歯大 口腔科学研究セ, 日本学術会議会員)
- CS-2 脳由来神経栄養因子による歯周組織再生
栗原 英見 (広大 院医歯薬保 歯周病態)
- CS-3 共刺激分子研究 — from bench to bedside and back to bench —
東 みゆき (医科歯科大 院医歯 分子免疫, 日本学術会議会員)
- CS-4 口腔顔面痛疾患に対する治療の将来に向けた方向性：
基礎研究からのフィードバックに希望はあるか？
矢谷 博文 (阪大 院歯 顎口腔機能再建 クラウンブリッジ補綴, 日本学術会議連携会員)
- CS-5 口腔顔面痛発症機構解明と臨床応用への可能性
岩田 幸一 (日大 歯 生理, 日本学術会議連携会員)

■ メインシンポジウム Main symposium

メインシンポジウム A

「アプライド・イメージングー先進イメージングによる生命医学のブレークスルー」

オーガナイザー：谷村 明彦（北医療大 歯 薬理）

飯村 忠浩（愛媛大 プロテオサイエンスセ・学術
支援セ・院医）

日 時：8月25日（木）9：00～11：00

会 場：B会場

MSA-1 In vivo イメージングを使った細胞内シグナルと生体機能の同時解析：

唾液腺腺房細胞の Ca^{2+} 応答と唾液分泌

谷村 明彦，根津 顕弘，森田 貴雄（北医療大 歯 薬理）

MSA-2 2光子顕微鏡を用いた骨恒常性維持機構の *in vitro* 解析

疋田 温彦（東大 院医 軟骨・骨再生医療寄付講座（富士ソフト））

MSA-3 マルチモーダル超解像法を用いた骨系細胞の機能解析

飯村 忠浩^{1~4}，李 智媛¹（¹愛媛大 プロテオサイエンスセ バイオイメージング，²愛媛大 学術支援セ 病態機能解析，³愛媛大 院医，⁴愛媛大病院 人工関節セ）

MSA-4 電子顕微鏡による親水環境での組織・細胞・分子の構造観察

佐藤 主税¹，海老原達彦¹，奥田 賢一²，川田 正晃³，佐藤 真理¹，
山澤徳志子⁴，水之江義充²，杉本 真也²

（¹産総研 バイオメディカル 構造生理研究グループ，²慈恵医大 細菌，³産総研 機能材料コンピューショナルデザイン，⁴慈恵医大 分子生理）

メインシンポジウム B

「Forefront of research to understand the oral micro-ecosystems」

オーガナイザー：佐藤 拓一（新潟大 医 保健）

大島 朋子（鶴大 歯 口腔微生物）

中澤 太（北医療大 歯 口腔生物 微生物）

日 時：8月25日（木）15：00～17：00

会 場：B会場

MSB-1 Oral microecosystem —Listen to the silent majority—

Nobuhiro Takahashi (Div Oral Ecol Biochem, Dept Oral Biol, Tohoku Univ Grad Sch Dent)

MSB-2 *Scardovia wiggsiae* and its potential role as a caries pathogen

Christine Kressirer, Anne Tanner (The Forsyth Institute, Cambridge, MA, USA)

MSB-3 The strategy for oral biofilm —The best use of oral *Veillonella*—

Izumi Mashima^{1,2}, Citra Fragrantia Theodorea², Hiroshi Miyakawa², Futoshi Nakazawa² (¹Postdoctoral Fellow of JSPS, ²Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido)

MSB-4 Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity

Gordon Ramage (Oral Sci Res Group, Glasgow Dent Sch, Sch Med, Dent Nursing, Univ Glasgow, UK)

メインシンポジウム C

「エナメル質の高度石灰化の謎；成熟期エナメル芽細胞の理解への挑戦」

オーガナイザー：原田 英光（岩医大 解剖 発生生物再生医学）
山越 康雄（鶴大 歯 分子生化）

日 時：8月26日（金）9：00～11：00

会 場：B会場

- MSC-1 成熟期エナメル芽細胞の形態と機能：オーバービュー
高野 吉郎（医科歯科大）
- MSC-2 成熟期エナメル芽細胞と KLK4 の役割
山越 康雄¹，小林 冴子²（¹鶴大 歯 分子生化，²鶴大 歯 小児歯）
- MSC-3 エナメル質石灰化に関わる TRP チャネルの発現と機能
岡部 幸司¹，緒方佳代子^{1,2}，進 正史¹，岡本富士雄¹，岡 暁子²，
鍛冶屋 浩¹
（¹福歯大 細胞生理，²福歯大 成育小児歯）
- MSC-4 成熟期エナメル芽細胞での V-ATPase の機能と高度石灰化との関連
原田 英光¹，依田 浩子²，佐原 資謹³，大島 勇人²，藤原 尚樹¹，
大津 圭史¹
（¹岩医大 解剖 発生再生，²新潟大 院医歯 硬組織形態，³岩医大 生
理 病態生理）
- MSC-5 成熟期エナメル芽細胞の分化制御と糖代謝の役割
依田 浩子（新潟大 院医歯 硬組織形態）

メインシンポジウム D

「口腔環境の中樞神経への影響」

オーガナイザー：安彦 善裕（北医療大 歯 生体機能・病態 臨床
口腔病理）

後藤 哲哉（鹿大 院医歯 歯科機能形態）

日時：8月26日（金）13：10～15：10

会場：B会場

MSD-1 歯周病，歯牙欠損がアルツハイマー病分子病態ならびに認知機能に及ぼす影響に関する研究

道川 誠（名市大 院医 病態生化）

MSD-2 幼若期における食物性状と高次脳機能の変調

小野 卓史（医科歯科大 院医歯 咬合機能矯正）

MSD-3 口腔感覚に関わる末梢-中枢神経間の賦活系および抑制系ネットワーク

倉本恵梨子，岩井 治樹，山中 淳之，後藤 哲哉（鹿大 院医歯 歯科機能形態）

MSD-4 ヒトが口腔で認知した味覚は中枢をどのように活性化させているのか：

脳地図から脳機能ネットワークへ

後藤多津子（東歯大 歯科放射線）

■ ランcheonセミナー Luncheon seminar

ランcheonセミナー 1

「硬組織の形態・機能解析のための光学顕微鏡のマルチモードな活用法—微分干渉から先進レーザー顕微鏡の応用例—」

日時：8月25日（木）12：00～12：50

会場：B会場

LS-1 飯村 忠浩^{1~4}，李 智媛¹（¹愛媛大 プロテオサイエンスセ バイオイメー
ング，²愛媛大 学術支援セ 病態機能解析，³愛媛大 院医，⁴愛媛大病院 人
工関節セ）

主催：(株)ニコインステック

ランチオンセミナー 2

「若手研究者のための Author Workshop : 学術論文作成に必要な出版倫理と画像処理について」

日時 : 8月25日 (木) 12:00~12:50

会場 : C 会場

LS-2 大島 勇人 (新潟大 院医歯 硬組織形態)

主催 : エルゼビア・ジャパン株式会社

ランチオンセミナー 3

「うま味研究の最前線—基礎から医療への応用と今後の展望—」

日時 : 8月25日 (木) 12:00~12:50

会場 : D 会場

LS-3-1 味覚の新知見 (うま味と塩味)

重村 憲徳^{1,2} (¹九大 院歯 口腔機能解析, ²九大 味覚嗅覚センサ研究開発セ)

LS-3-2 歯科医療による高齢者“うま味”感受性維持の重要性

佐藤しづ子, 庄司 憲明, 笹野 高嗣 (東北大 院歯 口腔病態外科 口腔診断)

主催 : 味の素(株)

■ サテライトシンポジウム Satellite Symposia

サテライトシンポジウム 1

「21世紀の歯科インプラントは基礎と臨床の融合から」

日 時：8月24日（水）12：30～14：10

会 場：B会場

オーガナイザー：久保木芳徳（北大 名誉教授・地球環境科学）
越智 守生（北医療大 歯 クラウンブリッジ・インプラント補綴）

- SS1-1 歯科インプラントはどこまで患者を満足させてきたか
古澤 利武¹，久保木芳徳²（¹山形大 院理工，古澤歯科医院，²北大 院地球環境科学）
- SS1-2 インプラント歯頸部閉鎖の問題の新しい解決法 ～歯肉統合～
八上 公利¹，定岡 直¹，久保木芳徳²，古澤 利武³，飴谷 彰洋⁴
（¹松歯大 院 健康増進口腔科学，²北大 名誉教授・地球環境科学研究，³山形大 工，⁴ハイレックスコーポレーション）
- SS1-3 新素材 CNTs のチタン表面処理への応用
横山 敦郎（北大 院歯 口腔機能補綴）
- SS1-4 アパタイトによるチタン表面処理の効用とその限界
越智 守生，仲西 康裕，廣瀬由紀人（北医療大 歯 インプラント補綴）
- SS1-5 象牙質マテリアルと骨誘導外科の融合による骨再生
村田 勝¹，赤澤 敏之²（¹北医療大 顎顔面口腔外科，²北海道立総合研究機構 産業技術研究本部 工業試験場）
- SS1-6 自己血液由来の PRP 応用と骨代謝マーカーによる硬組織・軟組織，両者の再生
奥寺 元（東京形成歯科研究会）
- SS1-7 チタンの骨内定着の生化学メカニズム解明・インプラント蛋白の意義と応用
久保木芳徳¹，古澤 利武²，八上 公利³（¹北大 院地球環境科学，²山形大 院理工，³松歯大 社会歯科）

サテライトシンポジウム 2

「歯科医学の基礎と臨床をつなぐ三次元超微形態学の新たな可能性」

日 時：8月24日（水）12：30～14：10

会 場：C会場

オーガナイザー：上岡 寛（岡大 院医歯薬 歯科矯正）
 菌村 貴弘（金沢医大 医 解剖二）

SS2-1 硬組織界面における3次元微細構造解析

平嶋 伸悟^{1,2,4}，太田 啓介¹，金澤知之進¹，都合重記暢^{1,3}，岡山 聡子¹，
楠川 仁悟²，中村桂一郎¹

（¹久留米大 医 顕微解剖，²久留米大 医 歯口セ，³久留米大 医 電顕室，⁴久留米大 高次脳疾患研）

SS2-2 3次元観察を基軸にした象牙質齲蝕の病態評価

三浦 治郎¹，清水 真人¹，榎本早希子²，荒井 重勇²

（¹阪大 院歯 総診，²名大 未来材料システム研）

SS2-3 骨細胞ネットワーク形成に与えるコラーゲン線維集束化の関与

橋本 真奈¹，長岡 紀幸²，飯村 忠浩³，大嶋 佑介³，原 徹⁴，
上岡 寛¹

（¹岡大 院医歯薬 歯科矯正，²岡大 歯 歯先端研セ，³愛媛大 PROS パイオイメーキング，⁴国立研究開発法人 物質・材料研究機構）

SS2-4 インプラント/骨界面の3次元観察

長岡 紀幸¹，吉原久美子²，丸尾 幸憲³

（¹岡大 院医歯薬 歯先端研セ，²岡大病院 新医療研開セ，³岡大病院 咬合・義歯補綴）

SS2-5 FIB-SEM を用いた2型糖尿病モデルラットにおける骨-インプラント結合の形態学的解析

川本真一郎¹，橋口 千琴²，菌村 貴弘³，西村 正宏¹

（¹鹿大 院医歯 口腔顎顔面補綴，²鹿大 院医歯 歯周病，³金沢医大 医 解剖 2）

サテライトシンポジウム3

「薬物受容体研究のあらたな取り組みーアセチルコリンを中心にー」

日 時：8月24日（水）12：30～14：10

会 場：D会場

オーガナイザー：谷村 明彦（北医療大 歯 薬理）

佐伯万騎男（新潟大 院医歯 歯科薬理）

- SS3-1 オーバービュー（受容体を介する薬物作用機序の新概念）
谷村 明彦（北医療大 歯 薬理）
- SS3-2 骨再生医療におけるアセチルコリンエステラーゼ阻害薬の新たな展開
佐藤 毅, 依田 哲也（埼玉医大 医 口腔外科）
- SS3-3 骨吸収性疾患の治療ターゲットとしての $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体
佐伯万騎男, 江草 宏（¹新潟大 院医歯 歯科薬理, ²東北大 院歯 分子・再生補綴）
- SS3-4 ムスカリン性アセチルコリン受容体の神経精神薬理学
田熊 一敏^{1,2}, 長谷部 茂¹, 中澤 敬信^{1,3}, 橋本 均^{2,3}, 松田 敏夫⁴,
吾郷由希夫³（¹阪大 院歯 薬理, ²阪大 院小児発達, ³阪大 院薬 神経薬理, ⁴阪大 院薬 薬物治療）
- SS3-5 片頭痛病態に関わるセロトニン及びセロトニン受容体の作用
崔 翼龍（理研 ライフサイエンス技術基盤研究セ 分子動態イメージング研究）
- SS3-6 コリン作動性ニューロンによる側坐核中型有棘細胞の機能調節
小林 真之（日大 歯 薬理）

サテライトシンポジウム 4

「若手の口腔生理学研究最前線」

日 時：8月24日（水）12：30～14：10

会 場：E会場

オーガナイザー：山村 健介（新潟大 院医歯 口腔生理）

船橋 誠（北大 院歯 口腔機能 口腔生理）

SS4-1 神経障害性疼痛発症に対する三叉神経節内ニューロン-グリア機能連関の関与

梶 佳織^{1,2}, 篠田 雅路¹, 清水 典佳², 岩田 幸一¹（¹日大 歯 生理, ²日大 歯 矯正）

SS4-2 エナメル質形成におけるプロテアーゼの役割

進 正史^{1,2}, 岡本富士雄¹, 鍛冶屋 浩¹, 緒方佳代子¹, 岡部 幸司¹
（¹福歯大 細胞生理, ²オハイオ州立大 歯 生物科学）

SS4-3 ライブセル蛍光イメージングの口腔疾患予防への応用

西出 真也, 藤岡容一郎, 堀内 浩水, 堀口 美香, 佐藤 絢,
Prabha Nepal, 王 婧, 南保明日香, 大場 雄介
（北大 院医 細胞生理）

サテライトシンポジウム 5

「口腔領域の脈管系 —口蓋の特徴—」

日 時：8月24日（水）12：30～14：10

会 場：F会場

オーガナイザー：佐藤 巖（日歯大 生命歯 解剖 I）

藤村 朗（岩医大 解剖 機能形態）

SS5-1 口蓋の血管と神経の三次元的位置関係

三輪 容子（日歯大 解剖 I）

SS5-2 口蓋の微細血管構築

戸田 伊紀（大歯大 解剖）

SS5-3 口蓋微小循環の形態と機能

松尾 雅斗¹, 高橋 俊介², 浜田 信城³（¹神歯大 院歯 口腔科学・歯科形態, ²神歯大 院歯 循環制御歯科, ³神歯大 院歯 微生物感染）

SS5-4 スクセス口蓋のリンパ管構築

安藤 禎紀¹, 畠山 慧², 藤村 朗¹（¹岩医大 歯 機能形態, ²岩医大 歯 歯科矯正）

サテライトシンポジウム 6

「口腔の痛覚受容解明への新たなアプローチ」

日 時：8月24日（水）12：30～14：10

会 場：G会場

オーガナイザー：須田 直人（明海大 歯 形態機能成育 歯科矯正）
安達 一典（明海大 歯 病態診断治療 薬理）

SS6-1 歯の移動に伴う疼痛の経時的評価

安達 一典¹，須田 直人²，坂上 宏¹（¹明海大 歯 薬理，²明海大 歯 矯正）

SS6-2 矯正力負荷によって生じる大脳皮質における興奮伝播の変化

小林 真之（日大 歯 薬理）

SS6-3 口腔粘膜の痛みと TRPV1 チャネル

城戸 瑞穂^{1,2}，吉住 潤子³，高尾 知佳²，吉本 怜子⁴，大山 順子³，
合島怜央奈¹，高岡 裕⁵，豊福 明⁶

（¹佐賀大 医 組織神経解剖，²九大 院歯 分子口腔解剖，³九大 顔面口腔外科，⁴九大 院歯 歯周病，⁵神戸大 院医，⁶医科歯科大 院歯 歯科心身医学）

サテライトシンポジウム 7

「Novel development of oral microbiology from the point of view of Porphyromonas-related genera」

日 時：8月24日（水）14：20～16：00

会 場：B会場

オーガナイザー：吉田 明弘（松歯大 口腔細菌）
浜田 信城（神歯大 微生物感染）

SS7-1 Type IX secretion system and gliding motility in Bacteroidetes phylum bacteria

Koji Nakayama (Div Microbiol Oral Infect, Dept Mol Microbiol Immunol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci)

- SS7-2 The role of *Porphyromonas gingivalis* hydrogen sulfide in mouse inflammation
Koki Shioya (Dept Oral Microbiol, Matsumoto Dent Univ)
- SS7-3 Epidemiology and transmission of *Porphyromonas gulae* among dogs and owners
Haruka Sasaki, Kiyoko Watanabe, Nobushiro Hamada (Div Microbiol, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ)
- SS7-4 Structural and mechanistic insights into a distinct type of pilus
Mikio Shoji¹, Qingping Xu², Satoshi Shibata¹, Mariko Naito¹, Keiko Sato¹, Ian A Wilson³, Koji Nakayama¹ (¹Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, Dept Microbiol Oral Infect, ²Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, SLAC National Accelerator Laboratory, USA, ³The Scripps Research Institute, USA)
- SS7-5 Osteoimmunology in periodontal disease
Masayuki Tsukasaki¹, Noriko Komatsu¹, Tomoki Nakashima², Hiroshi Takayanagi¹ (¹Dept Immunol, Grad Sch Med Fac Med, The Univ Tokyo, ²Dept Cell Signal, Grad Sch Med Dent Sci, Tokyo Med Dent Univ)

サテライトシンポジウム 8

「レドックスバイオロジーの新たなステージ」

日 時：8月24日（水）14：20～16：00

会 場：C会場

オーガナイザー：赤池 孝章（東北大 院医 環境保健医学）
上條竜太郎（昭大 歯 口腔生化）

- SS8-1 活性パルスルフィドによるレドックス制御の分子基盤
赤池 孝章（東北大 院医 環境保健医学）
- SS8-2 Nrf2 と eIF2 α -ATF4 ストレス応答経路のクロストークによるレドックス応答機構
伊東 健（弘前大 院医 分子生体防御）
- SS8-3 レドックスバイオロジーと歯科疾患
ーレドックスバランス変調による血管病としての歯周病ー
李 昌一（神歯大 横須賀・湘南・災害医療歯科研究セ）
- SS8-4 8-ニトロ-cGMP は新しい骨伸長因子である
宮本 洋一（昭大 歯 口腔生化）

サテライトシンポジウム 9

「健康長寿社会実現を目指す口腔ブレインサイエンスの最前線」

日 時：8月24日（水）14：20～16：00

会 場：D会場

オーガナイザー：中西 博（九大 院歯 口腔機能分子科学）
岩田 幸一（日大 歯 生理）

- SS9-1 歯周病菌感染による脳内アルツハイマー様病態の誘発メカニズム
武 洲^{1,2}, 中西 博¹（¹九大 院歯 口腔機能分子科学, ²九大 院歯
OBT 研究セ）
- SS9-2 島皮質オシレーションと味覚-摂食機能関連
豊田 博紀¹, 佐藤 元¹, 齋藤 充², 姜 英男¹（¹阪大 院歯 口腔
生理, ²鹿大 院医歯 口腔生理）
- SS9-3 味覚調節系と肥満によるその変化
吉田 竜介^{1,2}（¹九大 院歯 口腔機能解析, ²九大 OBT 研究セ）
- SS9-4 口腔顔面に発症する異所性痛覚過敏の末梢神経機構
篠田 雅路, 梶 佳織, 本田 訓也, 杉山 朋久, 岩田 幸一（日大 歯
生理）

サテライトシンポジウム 10

「機能と形態の統合的アプローチによる血管・唾液腺・骨の共創的研究」

日 時：8月24日（水）14：20～16：00

会 場：E会場

オーガナイザー：飯村 忠浩（愛媛大 プロテオサイエンスセ バイ
オイメーキング 学術支援セ 病態機
能解析）
樋田 京子（北大 遺伝子病制御研 血管生物）

- SS10-1 細胞系譜解析による生体内における骨髄間葉系幹細胞の解析
溝口 利英（松歯大 総歯研）

- SS10-2 Wnt と KIT シグナルの活性化バランスによる唾液腺の形づくりと機能獲得過程の制御
松本 真司¹, 栗本 聖之², 藤井 慎介³, 菊池 章¹
(¹阪大 院医 分子病態生化, ²阪大 院歯 口外 1, ³九大 院歯 口腔病理)
- SS10-3 PDGFR α シグナルによる pericytes の運命決定機構
岩山 智明^{1,2}, 脇坂 聡¹, 村上 伸也² (¹阪大 院歯 口腔解剖 1, ²阪大 院歯 口腔治療)
- SS10-4 機能的生細胞イメージングとオミクス解析による破骨細胞調節機能の解明
李 智媛¹, 飯村 忠浩^{1,2} (¹愛媛大 PROS バイオイメージング, ²愛媛大 学術支援セ 病態機能解析)
- SS10-5 がん微小環境における血管内皮細胞の特異性解明とその分子機構
樋田 京子, 間石 奈湖 (北大 遺伝子病制御研 血管生物)

サテライトシンポジウム 11

「災害大国日本における身元確認を考える — 歯科医師としての責務とは —

日 時：8月24日（水）14：20～16：00

会 場：F会場

オーガナイザー：斉藤 久子（千葉大 院医 法医）

佐藤真奈美（宮城県歯科医師会）

- SS11-1 東日本大震災における身元確認作業を経験して
大林由美子, 三宅 実 (香川大 医 歯科口腔外科)
- SS11-2 過去の災害において繰り返されてきた歯科身元確認における問題点
咲間 彩香, 斉藤 久子, 岩瀬博太郎 (千葉大 院医 法医)
- SS11-3 全ての歯科医師が歯科法医学者となる時
勝村 聖子¹, 佐藤 慶太^{1,2} (¹鶴大 歯 法医, ²鶴大 先制医療研究セ)
- SS11-4 大規模災害時における身元確認：歯科界の対応
佐々木啓一^{1,3}, 青木 孝文², 鈴木 敏彦³, 佐藤真奈美⁴
(¹東北大 院歯 口腔システム補綴, ²東北大 院情報科学, ³東北大 院歯 歯科法医情報, ⁴宮城県歯科医師会)

サテライトシンポジウム 12

「歯科基礎医学の面白さと研究者としてのキャリア ～SCADA: 分野を越えたつながりがもたらすもの～」

日 時：8月24日（水）14：20～16：00

会 場：G会場

オーガナイザー：井田 有亮（東大 医病院）

SS12-1 SCADA is Unique! 日本におけるスチューデントクリニシャンリサーチプログラム 22年の歩みを振り返る

奥村 哲¹, 石田 陽子²

(¹静岡理工大 総合情報 神経行動, ²新潟大 院医歯 歯教研開発)

SS12-2 Show the Spirit of Scientist !!! ～SCRP 大会を通して見つけたこと～

小林 良喜（日大松戸歯 微生物免疫）

SS12-3 SCRP に出場しよう！～SCADA と歯科基礎医学～

楠山 譲二（鹿大 院医歯 口腔生化）

サテライトシンポジウム 13

「The 30th Salivary Research Colloquium "Salivary glands: an unique and valuable experimental system"」

日 時：8月24日（水）16：10～17：50

会 場：B会場

オーガナイザー：谷村 明彦（北医療大 歯 薬理）

中本 哲自（松歯大 歯 歯科補綴）

SS13-1 Salivary glands: a unique and valuable system for oral biology and all biomedical science

Bruce J. Baum (Scientist Emeritus, Natl Inst Dent Craniofac Res)

SS13-2 胎仔マウス唾液腺の組織間における RNA 相互作用

林 徹^{1,2,3}, 柏俣 正典², Matthew P Hoffman³ (¹北里大 医衛 解剖, ²朝日大 歯 薬理, ³NIH NIDCR)

SS13-3 顎下腺腺腔構造維持における RhoGTPase Cdc42 の役割

設楽 彰子, Roberto Weigert (NCI, NIH)

- SS13-4 マウスを用いた唾液腺の生理学的解析
近藤 祐介¹, 中本 哲自², 向坊 太郎¹, 宗政 翔¹, 楠田優一郎¹,
宮城 勇大¹, 柄 慎太郎¹, 正木 千尋¹, 細川 隆司¹
(¹九歯大 口腔再建リハ, ²松歯大 補綴)
- SS13-5 唾液腺における概日リズムの発生と生後発達過程の検討
内田 仁司 (鶴大 歯 病理)

サテライトシンポジウム 14

「歯科医学における化学感覚研究の新展開」

日 時：8月24日(水) 16:10~17:50

会 場：C会場

オーガナイザー：長田 和実 (北医療大 歯 生理)

重村 憲徳 (九大 院歯 口腔機能解析)

- SS14-1 味細胞研究のパラダイムシフト
～味蕾幹細胞の同定と味覚研究への応用～
岩槻 健 (東農大 応生 食安健)
- SS14-2 ミラクリンによる甘味誘導効果の分子メカニズム
實松 敬介¹, 吉田 竜介^{1,2}, 重村 憲徳¹, ニノ宮裕三³
(¹九大 院歯 口腔機能, ²九大 OBT 研究セ, ³九大 味嗅覚センサ
感覚生理)
- SS14-3 咀嚼不全により低下した神経新生と嗅覚機能とその回復
柏柳 誠, 宇津木千鶴 (旭川医大 生理 神経機能)
- SS14-4 味覚と嗅覚の皮質内情報統合機構
溝口 尚子¹, 小林 真之², 村本 和世¹ (¹明海大 歯 形態機能成育 生
理, ²日大 歯 薬理)
- SS14-5 嗅覚訓練マウスによる芳香成分の口臭マスキング作用の評価
長田 和実 (北医療大 歯 生理)

サテライトシンポジウム 15

「口腔顔面領域の感覚－運動機能の統合」

日 時：8月24日（水）16：10～17：50

会 場：D会場

オーガナイザー：篠田 雅路（日大 歯 生理）
岩田 幸一（日大 歯 生理）

SS15-1 嚥下機能の理解から治療戦略へ

井上 誠, 辻村 恭憲, 真柄 仁, 辻 光順（新潟大 院医歯 摂食嚥下リハビリ）

SS15-2 覚醒制御に関わる脳内生理活性物質の三叉神経中脳路核ニューロンおよび閉口筋運動ニューロンに対する影響

井上 富雄, 中村 史朗, 中山希世美, 望月 文子, 清本 聖文（昭大 歯 口腔生理）

SS15-3 咀嚼はどのような神経回路によって情動の影響を受けるのか

吉田 篤, 佐藤 文彦, 加藤 隆史（阪大 院歯 口腔解剖2）

SS15-4 三叉神経系における痛覚伝達経路および中枢からの下行性制御について

後藤 哲哉, 倉本恵梨子, 岩井 治樹（鹿大 院医歯 機能形態）

SS15-5 三叉神経障害による異所性痛覚過敏へのグリアの関与

岩田 幸一, 篠田 雅路, 片桐 綾乃（日大 歯 生理）

サテライトシンポジウム 16

「歯科における再生医療技術等の実用化への課題」

日 時：8月24日（水）16：10～17：50

会 場：E会場

オーガナイザー：本田 雅規（愛院大 歯 口腔解剖）

SS16-1 歯周治療の重要性と困難性

三谷 章雄, 菊池 毅（愛院大 歯 歯周病）

- SS16-2 これまでの歯周組織再生療法の課題
小方 頼昌 (日大松戸歯 歯周治療)
- SS16-3 自己脂肪組織由来多系統前駆細胞移植による歯周組織再生療法の開発
竹立 匡秀¹, 沢田 啓吾¹, 李 千萬², 岩山 智明¹, 山本 智美¹,
森本 千晶¹, 平井 麻絵¹, 佐野 夕子¹, 松山 晃文³, 大倉 華雪³,
北村 正博¹, 村上 伸也¹
(¹阪大 院歯 口腔治療, ²阪大 院医 未来医療開発, ³医薬基盤・健康・
栄養研 難治性疾患治療開発・支援)
- SS16-4 自家細胞を用いた再生医療の普及への課題
畠 賢一郎 (株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)
- SS16-5 歯科における再生医療普及のためのプラットフォーム整備の重要性
飛田 護邦 (順天堂大 医 形成外科)

■ 一般演題（口演）

8月25日（木）9：00～9：30 C会場

免疫1・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：鈴木 敏彦（医科歯科大 院医歯 感染制御）

01-C1	Osteoprotegerin による腸管上皮 M 細胞の分化抑制機構とその意義 ○木村 俊介 ¹ , 武藤 麻未 ² , 岩永 敏彦 ¹ (北大 院医, ² 北大 院歯 矯正)
01-C2	CXCL4 は新規 Ni 結合タンパク質であり Ni アレルギーを増強する ○黒石 智誠 ¹ , 田中 志典 ^{1,2} , 遠藤 康男 ¹ , 菅原 俊二 ¹ (東北大 院歯 口腔分子制御, ² 東北大 院歯 小児歯)
01-C3	マウス唾液腺樹状細胞の同定とその免疫学的特徴の解析 ○陸 路 ^{1,2} , 田中 志典 ^{2,3} , 菅原 俊二 ² (東北大 院歯 口診, ² 東北大 院歯 口腔分子制御, ³ 東北大 院歯 小児歯)

8月25日（木）9：30～10：00 C会場

免疫2・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：長谷部 晃（北大 院歯 口腔分子生物）

01-C4	口腔粘膜炎症において局所に集積する T 細胞の解析 ○Hirunwidchayarat Worawalun, 大野 建州, Kang Siwen, 永井 重徳, 東 みゆき (医科歯科大 院医歯 分子免疫)
01-C5	Tr1 分化における PI3 の役割 ○Niken Adiba Nadya, 東 みゆき, 永井 重徳 (医科歯科大 院医歯 分子免疫)
01-C6	IL-12 と IL-18 は抗原非依存的にヒト V γ 9V δ 2 T 細胞を活性化する ○堂前 英資 ¹ , 合田 征司 ² , 吉川 美弘 ¹ , 鎌田 愛子 ¹ , 池尾 隆 ¹ (¹ 大歯大 生化, ² 神歯大 院歯 口腔科学)

8月25日（木）10：00～10：30 C会場

炎症・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：菅原 俊二（東北大 院歯 口腔分子制御）

01-C7	<i>Porphyromonas gingivalis</i> 由来 LPS による Th17 細胞への分化誘導におけるカテプシン S の役割 ○出来田雅人 ^{1,2} , 武 洲 ² , 中西 博 ² , 高橋 一郎 ¹ (¹ 九大 院歯 矯正, ² 九大 院歯 口腔機能分子)
01-C8	LPS 誘導 M1 マクロファージ分化におけるビスフォスフォネートの影響 ○金子 純也 ^{1,2} , 引地 尚子 ³ , 沖永 敏則 ¹ , 有吉 渉 ¹ , 西原 達次 ¹ (¹ 九歯大 感染分子生物, ² 九歯大 顎顔面外科, ³ 九歯大 口腔保健)
01-C9	<i>Streptococcus sanguinis</i> の IL-1 α 産生誘導活性におけるインフラマソームの関与 ○佐伯 歩 ¹ , 長谷部 晃 ¹ , 亀崎 良助 ¹ , 鈴木 敏彦 ² , 柴田健一郎 ¹ (北大 院歯 口腔分子微生, ² 医科歯科大 院医歯 細菌感染)

8月25日（木）10：30～11：00 C会場

微生物1・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：田中 芳彦（福歯大 歯 感染生物）

01-C10	歯周病関連細菌 <i>Treponema denticola</i> の株間性状比較解析 ○永野 恵司, 長谷川義明, 吉田 康夫, 吉村 文信 (愛院大 歯 微生物)
01-C11	<i>Prevotella intermedia</i> strain 17 と 17-2 間でのゲノム比較によるバイオフィーム関連遺伝子の検討 ○山中 武志, 南部 隆之, 円山 由郷, 王 宝禮, 真下 千穂, 山根 一芳 (大歯大 細菌)
01-C12	インプラント周囲炎と歯周炎における細菌叢メタトランスクリプトーム解析 ○渡辺 孝康 ¹ , 芝 多佳彦 ² , 加地 博 ³ , 竹内 康雄 ² , 丸山 史人 ⁴ , 和泉 雄一 ² , 中川 一路 ¹ (¹ 東大 院農生命 食の安全セ 食品病原微生物, ² 医科歯科大 院医歯 歯周病, ³ 医科歯科大 院医歯 顎顔面外科, ⁴ 京大 院医 微生物感染症)

8月25日(木) 11:00~11:30 C会場

微生物2 座長: 吉村 文信 (愛院大 歯 微生物)

01-C13	唾液マイクロバイームは歯周病の重症度を反映する ○影山 伸哉, 竹下 徹, 朝川美加李, 柴田 幸江, 山下 喜久 (九大 院歯 口腔予防)
01-C14	柿タンニンがポリマイクロバイアルバイオフィルムの Regrowth に与える影響 ○富山 潔 ¹ , 石澤 将人 ¹ , 渡辺 清子 ² , 河田 亮 ³ , 齋藤 正寛 ⁴ , 高橋 理 ³ , 浜田 信城 ² , Exterkate R.A.M ⁵ , 向井 義晴 ¹ (神歯大 院歯 う蝕制御修復, ² 神歯大 院歯 微生物感染, ³ 神歯大 院歯 神経組織発生, ⁴ 東北大 院歯 保存, ⁵ ACTA Preventive Dent The Netherlands)
01-C15	分子シャペロン DnaK をターゲットにした低分子化合物を用いた新しいバイオフィルム阻害法の開発 ○有田(森岡) 健一 ¹ , 永尾 潤一 ² , 成田 由香 ² , 橋本麻利江 ² , 田崎 園子 ² , 池崎晶二郎 ² , 長 環 ² , 田中 芳彦 ² (福歯大 先端科学セ, ² 福歯大 感染生物)

8月25日(木) 15:00~15:40 C会場

軟骨 座長: 西村 理行 (阪大 院歯 生化)

01-C16	NF-κB 非古典的経路は内軟骨性骨形成を調節している ○中富 千尋 ¹ , 古株彰一郎 ¹ , 松原 琢磨 ¹ , 中富 満城 ² , 浦田真梨子 ¹ , 自見英治郎 ¹ (九歯大 分子情報生化, ² 九歯大 解剖)
01-C17	マウス頭蓋底軟骨結合で発現する Dgcr2 遺伝子は肥大軟骨細胞の TGF-β シグナルを制御する ○梶原 景正 (東海大 医 基礎医学)
01-C18	軟骨細胞分化と増殖制御における promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) 転写因子の役割について ○内藤 昌子, 笠原 正彰, 大橋 晶子, 高橋 富久 (日大 歯 解剖)
01-C19	マウス下顎頭軟骨発生過程における Syndecan family の遺伝子発現に関する研究 ○藤川 芳織, 高橋 将人, 柴田 俊一 (医科歯科大 院歯 顎顔面解剖)

8月25日(木) 15:40~16:20 C会場

石灰化 座長: 久保田 聡 (岡大 院医歯薬 口腔生化)

01-C20	Fam20C 過剰発現マウスの作製とその解析について ○廣瀬 勝俊 ¹ , 佐藤 淳 ¹ , 社領 美紀 ¹ , 野田 百合 ¹ , 小守 壽文 ² , 豊澤 悟 ¹ (阪大 院歯 口腔病理, ² 長大 院 医歯薬 細胞生物)
01-C21	ヒト歯科インプラント周囲顎骨におけるマイクロ/ナノ構造特性 ○松永 智 ¹ , 是澤 和人 ^{1,2} , 小高 研人 ^{1,2} , 廣内 英智 ¹ , 森田 純晴 ^{1,2} , 山口 朗 ² , 阿部 伸一 ¹ (東歯大 解剖, ² 東歯大 口科研)
01-C22	(演題取下げ)
01-C23	骨代謝マーカーと自己血液由来 PRP 派生物質による再生の基礎と臨床 ○奥寺 元 (東京形成歯科研究会)

8月25日(木) 16:20~16:40 C会場

イオンチャネル 座長: 若森 実 (東北大 院歯 歯科薬理)

01-C24	骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に於ける亜鉛イオンによる過分極応答 ○光 夢凱, 吉田 卓史, 中村 卓史, 若森 実 (東北大 院歯 歯科薬理)
01-C25	ヒト口腔癌細胞株における TRP チャネルの機能解析 ○合島怜央奈 ^{1,2} , 吉本 怜子 ³ , 曹 愛琳 ^{1,4} , 森 啓輔 ² , 張 旌旗 ⁴ , 大崎 康吉 ⁴ , 檀上 敦 ² , 山下 佳雄 ² , 清島 保 ³ , 城戸 瑞穂 ¹ (佐賀大 医 組織神経解剖, ² 佐賀大 医 歯科口腔外科, ³ 九大 院歯 口腔病理, ⁴ 九大 院歯 分子口腔解剖)

8月25日(木) 9:00~9:40 D会場

腫瘍1 座長: 清島 保 (九大 院歯 口腔病理)

O1-D1	癌の増殖における非(低)カルボキシル化オステオカルシンの機能 ○林 慶和 ^{1,4} , 川久保-安河内 友世 ² , 倉谷 颯子 ^{1,3} , 中村 誠司 ⁴ , 平田 雅人 ¹ (九大 院歯 口腔細胞工学, ² 福岡大 薬 免疫・分子治療, ³ 九大 院歯 OBT 研究セ, ⁴ 九大 院歯 顎顔面腫瘍制御)
O1-D2	ヒト大腸癌, 肺腺癌および肺扁平上皮癌における Arl4c の発現とその機能解析 ○藤井 慎介 ¹ , 松本 真司 ² (九大 院歯 口腔病理, ² 阪大 院医 分子病態生)
O1-D3	SCF ^{β-TRCP} 依存的な FNIP2 タンパク質の量的変化は mTORC シグナル制御と BHD 症候群の病態発症に寄与する ○永嵩 勝之 ^{1,2,3} , 福島 秀文 ¹ , 星川 聖良 ¹ , 綿引 麻美 ¹ , 福本 敏 ¹ , 岡部 幸司 ² (東北大 院歯 先端再生医学, ² 福歯大 歯 細胞生理, ³ 福歯大 歯 口外)
O1-D4	Kruppel-like factor 5 遺伝子発現の必要最小領域と Sp3 の関与 ○美原 希美 (日歯大 生命歯 生)

8月25日(木) 9:40~10:10 D会場

腫瘍2 座長: 進藤 正信 (北大 院歯 口腔病理病態)

O1-D5	ユビキチン・プロテアソーム系による染色体パッセンジャー複合体タンパク質 Borealin の発現制御機構とその意義 ○常松 貴明, 工藤 保誠, 山田安希子, 新垣理恵子, 石丸 直澄 (徳大 院医歯薬 口腔分子病態)
O1-D6	多段階癌抑制分子のケモカイン CXCL14/BRAX は扁平上皮組織の分化制御分子か? ○生駒 丈晴 ¹ , 陽 暁艶 ^{2,3} , 小澤 重幸 ¹ , 前畑洋次郎 ² , 畑 隆一郎 ^{2,3} (神歯大 院 顎顔面外科, ² 神歯大 院 口腔科学, ³ 神歯大 院 口腔難治疾患研)
O1-D7	舌粘膜表在性病変における発癌 Field 解析 ○添野 雄一 (日歯大 生命歯 病理)

8月25日(木) 10:10~10:50 D会場

腫瘍3 座長: 美島 健二 (昭大 歯 口腔病理)

O1-D8	血液型抗原 Lewis y による口腔扁平上皮癌の悪性形質制御機構 ○浜村 和紀, 戸苅 彰史 (愛院大 歯 薬理)
O1-D9	口腔扁平上皮癌細胞由来エクソソームによる細胞間クロストークと病態形成 ○森岡 政彦 ^{1,2} , 川久保-安河内 友世 ² , 中村 誠司 ¹ (九大 院歯 顎顔面腫瘍制御, ² 福岡大 薬 免疫・分子治療)
O1-D10	浸潤先端部における Galectin-1 の過剰発現は口腔歯肉扁平上皮癌の転移に関与する ○野田 百合, 佐藤 淳, 廣瀬 勝俊, 社領 美紀, 豊澤 悟 (阪大 院歯 口腔病理)
O1-D11	酪氨酸激誘導 NETosis 様細胞死による DAMPs 及びリウマチ関連因子の放出 ○津田 啓方, 室伏 貴久, 山口 洋子, 鈴木 直人 (日大 歯 生)

8月25日(木) 10:50~11:30 D会場

エナメル質・エナメル質形成 座長: 笹川 一郎 (日歯大新潟 生命歯 先端研究セ)

O1-D12	cadherin/catenin シグナルを介した MMP-20 のエナメル質形成制御機構 ○進 正史 ¹ , 岡本富士雄 ¹ , 鍛冶屋 浩 ¹ , 緒方佳代子 ¹ , 岡部 幸司 ¹ (福歯大 細胞生理, ² オハイオ州立大 歯 生物学)
O1-D13	Semaphorin 4D-RhoA-Akt シグナルはエナメル芽細胞分化において amelogenin 分泌と細胞極性を協調的に制御する ○大津 圭史 ¹ , 依田 浩子 ² , 藤原 尚樹 ¹ , 原田 英光 ¹ (岩医大 歯 発生物, ² 新潟大 院医歯 硬組織形態)
O1-D14	歯のエナメル上皮における RUNX1 と CFBF は, マウスのエナメル質形成のために重要です ○Sarper Safiye ¹ , 三浦 治郎 ² , 山口 哲 ³ , 今里 聡 ³ , 森田 知里 ¹ , 山城 隆 ¹ (阪大 院歯 矯正, ² 阪大 院歯 総診, ³ 阪大 院歯 理工)

01-D15

エナメルとガノインの分子生物学的解析

○石山巳喜夫¹, 三上 正人², 中富 満城³, 岡 俊哉⁴, 佐藤 秋絵⁵, 田畑 純⁶, 笹川 一郎⁷ (1日歯大新潟 解剖 2, 2日歯大新潟 微生物, 3九歯大 解剖, 4日歯大新潟 生物, 5鶴大 歯 解剖 II, 6医科歯科大 院 硬組織構造, 7日歯大新潟 先端研セ)

8月25日(木) 15:00~15:40 D会場

歯の形成・歯髄細胞・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：原田 英光(岩医大 歯 発生生物再生医)

01-D16

マウス切歯の形態形成における非筋ミオシンIIの役割

○山中 淳之¹, Hu Jimmy², 後藤 哲哉¹, Klein Ophir² (1鹿大 院医歯 機能形態, 2Program in Craniofac Biol, Univ California, SF)

01-D17

上皮-間葉転換を起こしたヘルトヴィッチ上皮鞘は、歯根膜を構成する細胞外基質を産生する

○岡 暁子¹, 板家 智¹, 緒方佳代子¹, 戸田 雅子¹, 藤原 尚樹², 大津 圭史², 立岡 迪子¹, 尾崎 正雄¹, 原田 英光² (1福歯大 成長発達 小児歯, 2岩医大 歯 発生生物)

01-D18

マウス歯髄細胞/組織および骨芽細胞/組織における Meis2 発現

○川島 伸之¹, 齋藤 正寛², 興地 隆史¹ (1医科歯科大 院医歯 歯髄生物, 2東北大 院歯 歯科保存)

01-D19

急性期ラット脊髄圧挫損傷モデルに対する歯髄細胞移植による後肢運動機能回復への効果

○大谷 憲司^{1,2}, 佐久間重光³, 本田 雅規² (1株式会社再生医療推進機構, 2愛院大 歯 口腔解剖, 3愛院大 歯 冠・橋義歯)

8月25日(木) 15:40~16:10 D会場

発生・幹細胞・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：筒井 健夫(日歯大 生命歯 薬理)

01-D20

根尖乳頭組織由来幹細胞の象牙質形成に対するアスピリンの影響

○田中 陽介, 山座 孝義, 友田恵利佳, 園田聡一郎, 上原 範久, 久本由香里, 久木田敏夫 (九大 院歯 分子口腔解剖)

01-D21

一酸化窒素によるラット歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化促進

○園田聡一郎^{1,2}, 山座 孝義¹, 友田恵利佳¹, 田中 陽介¹, 久木田敏夫¹ (1九大 院歯 分子口腔解剖, 2九大 院歯 歯周)

01-D22

3次元培養される骨髄間葉系幹細胞集塊 Clumps of a MSC/ECM complex (C-MSC)における YAP/TAZ シグナルの解析

○小松 奈央, 加治屋幹人, 藤田 剛, 栗原 英見 (広大 院医歯薬保 歯周)

8月25日(木) 16:10~16:50 D会場

口蓋・顔面の発生・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：久木田敏夫(九大 院歯 分子口腔解剖)

01-D23

口唇口蓋裂患児由来乳歯幹細胞の解析

○山座 孝義¹, 山座 治義², 園田聡一郎¹, 友田恵利佳^{1,2}, 田中 陽介¹, 上原 範久¹, 久本由香里¹, 野中 和明², 久木田敏夫¹ (1九大 院歯 分子口腔解剖, 2九大 院歯 小児口腔)

01-D24

Runx シグナリングは一次口蓋と二次口蓋の融合に Tgfb3 を介して関与している

○Sarper Safiye, 黒坂 寛, 三原 聖美, 青山 剛三, 山城 隆 (阪大 院歯 矯正)

01-D25

レチノイン酸シグナルと Shh シグナルの相互作用が顔面形成に及ぼす役割

○Wang Qi, 山城 隆, 黒坂 寛 (阪大 院歯 矯正)

01-D26

転写因子 Hand2 はホメオボックス型転写因子群の発現調節を伴って上顎を下顎へ形質転換する

○船戸 紀子 (医科歯科大 医歯共同セ 疾患遺伝子)

8月26日(金) 9:00~9:30 C会場

唾液腺1・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：柏俣 正典(朝日大 歯 歯科薬理)

02-C1

唾液腺の形態形成における性差と Runx1 の制御機構について

○小野 瞳¹, Sarper Safiye², 山城 隆², 阪井 丘芳¹ (1阪大 院歯 顎治, 2阪大 院歯 矯正)

O2-C2	ラット舌下腺の出生前後に存在する数種の分泌顆粒に関する内因性ペルオキシダーゼ活性の分析電子顕微鏡分析 ○盛口 敬一, 本田 雅規 (愛院大 歯 口腔解剖)
O2-C3	ヒト全唾液における Basic Proline Rich Lacrimal Protein (BPLP) の動態解析 ○瀬賀 拓哉 ¹ , 今井あかね ² , 加藤 哲男 ³ , 斎藤 英一 ¹ (新潟工大 院工, ² 日歯大新潟短大 歯科衛生, ³ 東歯大 化学)

8月26日(金) 9:30~10:00 C会場

唾液腺 2 座長: 吉垣 純子 (日大松戸歯 生理)

O2-C4	耳下腺腺房細胞における alpha 1-アドレナリン受容体刺激と低張による AQP5 の細胞内移動 ○Bragiel Aneta, Pieczonka Tomasz, 石川 康子 (徳大 院医歯薬 分子薬理)
O2-C5	アセチルコリンによる顎下腺の Ca ²⁺ オシレーションにおける腺血流動態の影響 ○根津 顕弘 ¹ , 森田 貴雄 ¹ , 石井 久淑 ² , 谷村 明彦 ¹ (北医療大 歯 薬理, ² 北医療大 歯 生理)
O2-C6	口腔乾燥治療薬の継続服用による有効性の検討 ○小野 瞳, 井階 一樹, 阪井 丘芳 (阪大 院歯 顎治)

8月26日(金) 10:00~10:30 C会場

代謝 座長: 戸苅 彰史 (愛院大 歯 薬理)

O2-C7	軟骨組織におけるメラトニンの作用 ○服部 高子, 西田 崇, 久保田 聡 (岡大 院医歯薬 口腔生化)
O2-C8	DEC1 が示す老化マウス肝臓における FGF21 の抑制作用 ○Bhawal Ujjal ¹ , 鈴木 正敏 ² , 藤田 裕 ³ , 内山 敏一 ³ , 有川 量崇 ⁴ , 渋谷 鑠 ² , 平塚 浩一 ¹ (日大松戸歯 生化・分子生物, ² 日大松戸歯 麻酔, ³ 日大松戸歯 公衆予防歯, ⁴ 日大松戸歯 社会歯 (医療情報学))
O2-C9	オステオカルシンの代謝改善効果における GLP-1 の役割 ○溝上 顕子 ^{1,2} , 川久保-安河内 友世 ³ , 竹内 弘 ⁴ , 平田 雅人 ² (九大 院歯 OBT 研究セ, ² 九大 院歯 口腔細胞工学, ³ 福岡大 薬 免疫・分子治療, ⁴ 九歯大 応用薬理)

8月26日(金) 10:30~11:00 C会場

血管 座長: 佐藤 巖 (日歯大 生命歯 解剖一)

O2-C10	PI3K-Akt と mTORC1 シグナルは血管内皮細胞の伸長機能を制御する ○田村-辻 潔美, 田村 正人 (北大 院歯 口腔分子生化)
O2-C11	鶏胚を用いた脈管新生機構の形態学的解析について ○原 矢委子 ¹ , 井上 孝二 ² , 佐藤 哲二 ¹ (鶴大 歯 解剖・組織細胞, ² 鶴大 歯 電子顕微鏡研究セ)
O2-C12	細胞外マトリックスタンパクフィブリン7とそのC末端フラグメントタンパクによる新しい血管関連疾患治療の可能性 - フィブリン7の <i>in vivo</i> における血管新生抑制活性 - ○池内 友子 ¹ , Forcinito Patricia ¹ , de Vega Susana ² , Amaral Juan ³ , Rodriguez Ignacio ³ , 平澤 (有川) 恵理 ² , 山田 吉彦 ¹ (米国立衛生研 歯科・頭蓋顔面研, ² 順天堂大 院医 老人性疾患病態治療研究セ, ³ 米国立衛生研 眼研究所)

8月26日(金) 11:00~11:20 C会場

細胞死 座長: 坂上 宏 (明海大 歯 薬理)

O2-C13	過酸化水素による歯肉由来線維芽細胞と三次元歯肉モデルの酸化障害に対する水素水の防御効果 ○肖 黎 ¹ , 三羽信比古 ² (日歯大 生命歯 薬理, ² 県立広島大)
O2-C14	ヒト乳歯幹細胞におけるビリルビン添加による細胞生存への影響 ○友田恵利佳 ^{1,2} , 山座 孝義 ¹ , 山座 治義 ² , 田中 陽介 ¹ , 園田聡一郎 ¹ , 野中 和明 ² , 久木田敏夫 ¹ (九大 院歯 分子口腔解剖, ² 九大 院歯 小児口腔)

8月26日(金) 13:10~13:40 C会場

解剖・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：江尻 貞一(朝日大 歯 口腔解剖)

02-C15	高齢者の輪状甲状関節に関する組織学的研究 ○阿部 伸一, 松永 智, 山本 将仁, 北村 啓(東歯大 解剖)
02-C16	ヒト舌静脈に関する肉眼解剖学的研究 ○関 伸一郎 ¹ , 春原 正隆 ¹ , 三輪 容子 ¹ , 馬場 麻人 ² , 北村清一郎 ³ , 佐藤 巖 ¹ (¹ 日歯大 生命歯 解剖1, ² 徳大 院 医歯薬 顎顔面形態, ³ 森ノ宮医療大 保健医療 理学療法)
02-C17	マイクロX線CTを用いた上顎小臼歯の髄室部における加齢的变化 ○浅見 瑠璃 ¹ , 網干 博文 ² , 岩脇 淳志 ¹ , 大高 祐聖 ³ , 田中 晃伸 ⁴ , 坂 英樹 ^{1,5} (¹ 明海大 歯 歯法医, ² 日大 歯 法医, ³ 明海大 歯 放射線, ⁴ タナカ歯科, ⁵ 明海大 歯 歯法医セ)

8月26日(金) 13:40~14:00 C会場

その他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：堤 博文(日大 歯 法医)

02-C18	災害時の身元確認作業を想定した研修会プログラムの構築と実施 ○山田 良広(神歯大 院歯 災害医療歯・法医歯)
02-C19	携帯型X線発生装置撮影時の防護に関する研究 ○岩脇 淳志 ¹ , 大高 祐聖 ² , 浅見 瑠璃 ¹ , 田中 晃伸 ³ , 坂 英樹 ^{1,4} (¹ 明海大 歯 病態診断治療 歯法医, ² 明海大 歯 病態診断治療放射線, ³ タナカ歯科, ⁴ 明海大 歯 歯法医セ)

8月26日(金) 14:00~14:40 C会場

微生物3・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：古西 清司(日歯大 生命歯 微生物)

02-C20	肺炎球菌の菌体表層タンパク PfbA は宿主の自然免疫機構からの回避に寄与する ○山口 雅也, 広瀬雄二郎, 後藤 花奈, 住友 倫子, 中田 匡宣, 川端 重忠(阪大 院歯 口腔細菌)
02-C21	C1q との相互作用を介する化膿レンサ球菌の補体免疫回避機構 ○小川真理子, 住友 倫子, 毛利 泰士, 山口 雅也, 中田 匡宣, 川端 重忠(阪大 院歯 口腔細菌)
02-C22	インフルエンザウイルス感染に伴い上皮表層に誘導される GP96 は化膿レンサ球菌の上皮細胞への付着を亢進させる ○住友 倫子, 中田 匡宣, 毛利 泰士, 小川真理子, 山口 雅也, 川端 重忠(阪大 院歯 口腔細菌)
02-C23	化膿レンサ球菌の二成分制御系による nisin 耐性機構の解析 ○松尾 美樹, 小松澤 均(鹿大 院医歯 口腔微生物)

8月26日(金) 14:40~15:10 C会場

微生物4・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：小松澤 均(鹿大 院医歯 口腔微生物)

02-C24	<i>Streptococcus gordonii</i> DL1 による赤血球凝集活性と血小板凝集活性には Hsa の 2 つのアルギニン残基が関与する ○田代有美子, 高橋 幸裕, 古西 清司(日歯大 生命歯 微生物)
02-C25	タイ児童の口腔清掃状態と唾液中のベイオネラ属細菌種の分布と出現頻度 ○Theodora Citra ^{1,2} , 眞島いづみ ^{1,3} , 中澤 太 ¹ (¹ 北医療大 歯 微生物, ² インドネシア大 歯 口腔生物, ³ 学振 特別研究員 PD)
02-C26	タイ児童舌苔から分離された <i>Veillonella</i> 属新菌種の塩基配列解析 ○眞島いづみ ^{1,2} , Theodora Citra ² , 中澤 太 ² (¹ 学振 特別研究員 PD, ² 北医療大 歯 微生物)

8月26日(金) 9:00~9:30 D会場

神経・筋1..... 座長：田崎 雅和(東歯大 歯 生理)

O2-D1	下歯槽神経切除後の顔面皮膚感覚機能回復に対する GDNF の有用性 ○渡辺 雅弘 ¹ , 篠田 雅路 ² , 菅野 直之 ¹ , 佐藤 秀一 ¹ , 岩田 幸一 ² (1日大 歯 保存 III, 2日大 歯 生理)
O2-D2	下歯槽神経の再生過程における細胞接着分子の発現変化 ○鈴木 達郎 ¹ , 近藤 真啓 ² , 菅野 直之 ¹ , 岩田 幸一 ² , 佐藤 秀一 ¹ (1日大 歯 保存 III, 2日大 歯 生理)
O2-D3	ラット TG ニューロンにおける象牙芽細胞機械刺激誘発性活動電位記録 ○佐藤 正樹, 木村 麻記, 小島 佑貴, 東川明日香, 陽田みゆき, 小倉 一宏, 望月 浩幸, 河野 恭佑, 澁川 義幸, 田崎 雅和(東歯大 生理)

8月26日(金) 9:30~10:10 D会場

神経・筋2..... 座長：井上 富雄(昭大 歯 口腔生理)

O2-D4	ウサギ咀嚼様運動中の開口反射変調は咬合挙上に適応する ○松永 知子, 森田 匠, 平場 勝成(愛院大 歯 生理)
O2-D5	ラット三叉神経運動核背側領域に存在する Phox2b 陽性ニューロンの電気生理学的特性 ○那小屋公太 ^{1,2} , 中村 史朗 ² , 中山希世美 ² , 望月 文子 ² , 清本 聖文 ² , 井上 富雄 ² (1昭大 歯 口腔 I, 2昭大 歯 口腔生理)
O2-D6	ラット顎筋筋紡錘からの感覚入力を受ける三叉神経上核の同定 ○佐藤 文彦, 加藤 隆史, 吉田 篤(阪大 院歯 口腔解剖 2)
O2-D7	PRIP による脳内炎症が誘発する摂食抑制行動の調節 ○山脇 洋輔, 兼松 隆(広大 院医歯薬保 細胞分子薬理)

8月26日(金) 10:10~10:40 D会場

神経・筋3..... 座長：篠田 雅路(日大 歯 生理)

O2-D8	矯正力負荷下の歯根膜刺激に対する大脳皮質の神経応答 ○堀貫 恵利 ^{1,2} , 清水 典佳 ¹ , 越川 憲明 ² , 小林 真之 ² (1日大 歯 矯正, 2日大 歯 薬理)
O2-D9	下歯槽神経損傷後の異所性疼痛に対するマクロファージの関与 ○Dulguun Batbold ¹ , 篠田 雅路 ¹ , 山口 聡 ² , 岩田 幸一 ¹ (1日大 歯 生理, 2医科歯科大 院医歯)
O2-D10	ラット三叉神経節における VNUT を介した神経細胞, 衛星細胞, およびミクログリア様細胞間の細胞外 ATP 情報伝達 ○岩井 治樹, 倉本恵梨子, 山中 淳之, 後藤 哲哉(鹿大 院医歯 機能形態)

8月26日(金) 10:40~11:20 D会場

神経・筋4..... 座長：奥村 敏(鶴大 歯 生理)

O2-D11	TLE3 による MyoD の転写活性制御機構 ○古株彰一郎, 中富 千尋, 松原 琢磨, 自見英治郎(九歯大 健康増進 分子情報生化)
O2-D12	<i>Polphyromonas gingivalis</i> 由来 LPS が心筋, 骨格筋に及ぼす影響 ○川村 直矢 ¹ , 大貫 芳樹 ² , 奥村 敏 ² , 五味 一博 ¹ , 氏家 優子 ¹ , 梅木 大輔 ³ , 伊藤 愛子 ³ (1鶴大 歯 歯周病, 2鶴大 歯 生理, 3鶴大 歯 矯正)
O2-D13	β_2 アドレナリン受容体刺激による cAMP 活性化因子 Epac1 依存性の筋肥大効果 ○大貫 芳樹 ¹ , 梅木 大輔 ² , 成山明具美 ³ , 伊藤 愛子 ² , 川村 直矢 ⁴ , 八木澤由佳 ² , 奥村 敏 ¹ (1鶴大 歯 生理, 2鶴大 歯 矯正, 3鶴大 歯 小児歯, 4鶴大 歯 歯周病)
O2-D14	咬筋における β アドレナリン受容体のサブタイプ特異的な役割 ○伊藤 愛子 ¹ , 大貫 芳樹 ² , 梅木 大輔 ¹ , 石川美佐緒 ³ , 川村 直矢 ⁴ , 八木澤由佳 ¹ , 中村 芳樹 ¹ , 奥村 敏 ² (1鶴大 歯 矯正, 2鶴大 歯 生理, 3鶴大 歯 口腔解剖, 4鶴大 歯 歯周病)

8月26日(金) 13:10~13:50 D会場

骨代謝1・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：自見英治郎(九歯大 分子情報生化)

02-D15	骨芽細胞と脂肪細胞の分化におけるプロテインホスファターゼ PP2A C α の役割 ○岡村 裕彦 ¹ , 吉田 賀弥 ^{1,2} , 寺町 順平 ² (1徳大 院医歯薬 口腔組織, 2徳大 院医歯薬 口腔保健教育)
02-D16	エピプロフィンによる骨代謝調節 ○中村 卓史 ¹ , 中村 友昭 ^{1,2} , 若森 実 ¹ , 福本 敏 ² (1東北大 院歯 歯科薬理, 2東北大 院歯 小児歯)
02-D17	新規 Gap junction protein, Pannexin 3 は connexin 43 とは違う機能と発現パターンを示しながら骨形成を制御する ○石河 真幸 ¹ , Geneva Williams ² , 池内 友子 ³ , 酒井 陽 ³ , 福本 敏 ⁴ , 山田 吉彦 ³ (1東北大 院歯 歯科保存, 2ワシントン大, 3米国立衛生研, 4東北大 院歯 小児歯)
02-D18	PKR は骨芽細胞において <i>Porphyromonas gingivalis</i> が誘導する NLRP3 発現を NF- κ B 経路を介して制御する ○吉田 賀弥 ¹ , 岡村 裕彦 ² (1徳大 院医歯薬 口腔保健教育, 2徳大 院医歯薬 口腔組織)

8月26日(金) 13:50~14:20 D会場

骨代謝2・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：小守 壽文(長大 院医歯薬 細胞生物)

02-D19	BMP9 は Wnt 非依存的に骨芽細胞の GSK3 β / β -catenin シグナルを活性化する ○松口 徹也 ¹ , 榮樂奈保子 ² , 楠山 譲二 ¹ , 大西 智和 ¹ (1鹿大 院医歯 口腔生化, 2鹿大 院医歯 歯周病)
02-D20	RANKL 結合ペプチド(OP3-4)の注射投与は, BMP-2 により誘導されるマウス上顎の骨造成を促進する ○上原 智己 ¹ , 田村 幸彦 ² , 宮新美智世 ¹ , 青木 和広 ² (1医科歯科大 院医歯 小児歯, 2医科歯科大 院医歯 硬組織薬理)
02-D21	JNK シグナリングは骨芽細胞の多様性分化を制御する ○楠山 譲二, 大西 智和, 松口 徹也 (鹿大 院医歯 口腔生化)

8月26日(金) 14:20~14:50 D会場

破骨細胞1・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：羽毛田慈之(明海大 歯 口腔解剖)

02-D22	タモキシフェン誘導性 CCN2 欠損マウス由来の骨細胞様細胞の破骨細胞形成能 ○西田 崇 ¹ , 久保田 聡 ^{1,2} , 滝川 正春 ² (1岡大 院医歯薬 口腔生化, 2岡大 歯 先端研セ)
02-D23	新規アクチン結合分子 PPP1r18 は破骨細胞のアクチンリング形成を阻害する ○松原 琢磨 ¹ , 中富 千尋 ¹ , 古株彰一郎 ¹ , 山本 照子 ² , 自見英治郎 ¹ (1九歯大 分子情報生化, 2東北大 院歯 顎口腔矯正)
02-D24	Wnt5a-Ror2 シグナルは Rho-Pkn3-c- <i>Src</i> 経路を介して破骨細胞の骨吸収活性を制御する ○上原 俊介 ¹ , 山下 照仁 ² , 宇田川信之 ¹ , 高橋 直之 ² , 小林 泰浩 ² (1松歯大 口腔生化, 2松歯大 総歯研)

8月26日(金) 14:50~15:10 D会場

破骨細胞2・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 座長：片桐 岳信(埼玉医大 ゲノム 病態生理)

02-D25	病的に活性化された破骨細胞：形成条件の検討と蛍光プローブを用いた骨吸収イメージング ○白鳥 卓麻 ^{1,3} , 久木田明子 ² , 上原 範久 ¹ , 久本由香里 ¹ , 張 旌旗 ¹ , 山座 孝義 ¹ , 古谷野 潔 ³ , 久木田敏夫 ¹ (1九大 院歯 分子口腔解剖, 2佐賀大 医 微生物, 3九大 院歯 インプラント)
02-D26	Galectin-9 による破骨細胞分化抑制因子 MafB の発現制御 ○久本由香里 ¹ , 上原 範久 ¹ , 久木田明子 ² , 山座 孝義 ¹ , 久木田敏夫 ¹ (1九大 院歯 分子口腔解剖, 2佐賀大 医 微生物)

■ 一般演題 (ポスター)

8月25日(木) 17:00~18:00 ポスター会場

モリタ賞 解剖学

P1-1	唾液腺の形態形成における性差と Runx1 の制御機構について ○小野 瞳 ¹ , Sarper Safiye ² , 山城 隆 ² , 阪井 丘芳 ¹ (¹阪大 院歯 顎治, ²阪大 院歯 矯正)
P1-2	胎生期マウス外側翼突筋停止部における付着様式の獲得 ○永倉遼太郎, 北村 啓, 山本 将仁, 松永 智, 阿部 伸一 (東歯大 解剖)
P1-3	筋再生過程における Tcf4 の役割 ○小川 雄大, 小高 研人, 山本 将仁, 松永 智, 阿部 伸一 (東歯大 院歯 解剖)
P1-4	TRPV4 チャネルを介した温度変化による口腔上皮細胞調節 ○吉本 怜子 ^{1,2} , 合島怜央奈 ⁴ , 大崎 康吉 ³ , 曹 愛琳 ³ , 張 旌旗 ³ , 清島 保 ² , 城戸 瑞穂 ⁴ (¹九大 院歯 歯周, ²九大 院歯 口腔病理, ³九大 院歯 分子口腔解剖, ⁴佐賀大 医 組織・神経解剖)
P1-5	ラット三叉神経節における TRPC の発現 ○藤田 雅俊 ¹ , 佐藤 匡 ² , 矢島 健大 ² , 市川 博之 ² (¹東北大 院歯 麻酔, ²東北大 院歯 口腔器官構造)
P1-6	Galectin-9 による破骨細胞分化抑制因子 MafB の発現制御 ○久本由香里 ¹ , 上原 範久 ¹ , 久木田明子 ² , 山座 孝義 ¹ , 久木田敏夫 ¹ (¹九大 院歯 分子口腔解剖, ²佐賀大 医 微生物)
P1-7	Receptor activator of NFκB ligand (RANKL) によるマウス気管・気管支上皮からの M 細胞分化誘導 ○武藤 麻未 ¹ , 木村 俊介 ² , 吉沢 早織 ¹ , 岩永 敏彦 ² , 飯田順一郎 ¹ (¹北大 院歯 矯正, ²北大 院医 組織細胞)
P1-8	ラットエブネル腺の筋上皮細胞の分布と形態 ○平良芙蓉子 ^{1,2} , 川邊 好弘 ^{1,3} , 坂東 康彦 ¹ , 崎山 浩司 ¹ , 天野 修 ¹ (¹明海大 歯 解剖, ²明海大 歯 口外 2, ³明海大 歯 オーラルリハビリ)
P1-9	ラット舌下腺におけるアディポネクチンの局在 ○三宅 言輝 ^{1,2} , 平良芙蓉子 ^{1,2} , 坂東 康彦 ¹ , 崎山 浩司 ¹ , 天野 修 ¹ (¹明海大 歯 解剖, ²明海大 歯 口腔外科 2)
P1-10	マウス咬筋の成長発育における CGRP の発現について ○我妻 由梨, 三輪 容子, 佐藤 巖 (日歯大 生命歯 解剖 1)

モリタ賞 生化学

P1-11	ヒト全唾液における Basic Proline Rich Lacrimal Protein (BPLP) の動態解析 ○瀬賀 拓哉 ¹ , 今井あかね ² , 加藤 哲男 ³ , 斎藤 英一 ¹ (¹新潟工大 院工, ²日歯大新潟短大 歯科衛生, ³東歯大 化学)
P1-12	マウス口腔扁平上皮癌細胞株 (Sq1979) の液性因子による間葉系細胞 (10T1/2) を介した免疫抑制作用の促進 ○伊藤 宏衣 ¹ , 神谷 真子 ^{2,3} , 鷺見 成紀 ^{1,2} , 川木 晴美 ² , 高山 英次 ² , 梅村 直己 ² , 稲垣 慶則 ^{2,4} , 村松 泰徳 ¹ , 住友伸一郎 ¹ , 近藤 信夫 ² (¹朝日大 歯 口外, ²朝日大 歯 口腔生化, ³朝日大 経営 化学, ⁴朝日大 歯 麻酔)
P1-13	ヒト扁平上皮癌細胞 HSC-4 において TGF-β1 と BMP-2 は反動的に作用する ○千葉 高大 ¹ , 客本 斉子 ² , 石崎 明 ² , 加茂 政晴 ² (¹岩医大 歯 口外, ²岩医大 歯 生化)
P1-14	真空紫外光 (VUV) 照射後に各種条件下で保存した親水化チタン基板の特性解析 ○新谷 耕平 ^{1,2} , 川木 晴美 ² , 石樽 大嗣 ^{1,2} , 巽 勇介 ^{1,2} , 梅村 直己 ² , 神谷 真子 ³ , 高山 英次 ² , 堀田 正人 ¹ , 土井 豊 ⁴ , 近藤 信夫 ² (¹朝日大 歯 保存, ²朝日大 歯 口腔生化, ³朝日大 経営 化学, ⁴朝日大 歯)
P1-15	麻酔薬が癌組織微小環境における免疫制御におよぼす影響 ○稲垣 慶則 ^{1,2} , 神谷 真子 ^{2,3} , 梅村 直己 ² , 川木 晴美 ² , 高山 英次 ² , 鷺見 成紀 ^{2,4} , 伊藤 宏衣 ^{2,4} , 櫻井 学 ¹ , 智原 栄一 ¹ , 近藤 信夫 ² (¹朝日大 歯 麻酔, ²朝日大 歯 口腔生化, ³朝日大 経営 化学, ⁴朝日大 歯 口外)
P1-16	オートクレーブ滅菌象牙質顆粒 / 幹細胞ハイブリッド骨補填材の機能評価 ○奥野公巳郎 ^{1,2} , 川木 晴美 ² , 田中 雅士 ¹ , 瀧谷 佳晃 ¹ , 河野 哲 ¹ , 梅村 直己 ² , 高山 英次 ² , 神谷 真子 ^{2,3} , 吉田 隆一 ¹ , 近藤 信夫 ² (¹朝日大 歯 歯内療法, ²朝日大 歯 口腔生化, ³朝日大 経営 化学)
P1-17	Kruppel-like factor 5 遺伝子発現の必要最小領域と Sp3 の関与 ○美原 希美 (日歯大 生命歯 生化)
P1-18	Surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラーのイオン溶出特性評価 ○巽 勇介 ^{1,2} , 川木 晴美 ² , 石樽 大嗣 ^{1,2} , 新谷 耕平 ^{1,2} , 梅村 直己 ² , 神谷 真子 ³ , 高山 英次 ² , 堀田 正人 ¹ , 近藤 信夫 ² (¹朝日大 歯 修復, ²朝日大 歯 口腔生化, ³朝日大 経営 化学)
P1-19	癌の増殖における非(低)カルボキシル化オステオカルシンの機能 ○林 慶和 ^{1,4} , 川久保-安河内 友世 ² , 倉谷 顕子 ^{1,3} , 中村 誠司 ⁴ , 平田 雅人 ¹ (¹九大 院歯 口腔細胞工学, ²福岡大 薬 免疫・分子治療, ³九大 院歯 OBT 研究セ, ⁴九大 院歯 顎顔面腫瘍制御)

P1-20	JNK シグナリングは骨芽細胞の多様性分化を制御する ○楠山 謙二, 大西 智和, 松口 徹也 (鹿大 院医歯 口腔生化)
P1-21	口腔扁平上皮癌の原発巣と転移巣における骨髄由来免疫抑制細胞の検討 ○鷺見 成紀 ¹ , 梅村 直己 ² , 高山 英次 ² , 伊藤 宏衣 ¹ , 神谷 真子 ³ , 川木 晴美 ² , 近藤 信夫 ² , 住友伸一郎 ¹ (朝日大 歯 口外, ² 朝日大 歯 口腔生化, ³ 朝日大 経営 化学)
P1-22	TPD52 遺伝子の発現は TIA-1 及び TIAR によって mRNA の安定性を介して転写後制御される ○本橋 宏美, 椋代 義樹 (昭大 歯 口外)
P1-23	細胞外マトリックスタンパクフィブリン 7 とその C 末端フラグメントタンパクによる新しい血管関連疾患治療の可能性 –フィブリン 7 の <i>in vivo</i> における血管新生抑制活性– ○池内 友子 ¹ , Forcinito Patricia ¹ , de Vega Susana ² , Amaral Juan ³ , Rodriguez Ignacio ³ , 平澤 (有川) 恵理 ² , 山田 吉彦 ¹ (米国立衛生研 歯科・頭蓋顔面研, ² 順天堂大 院医 老人性疾患病態治療研究セ, ³ 米国立衛生研 眼研)
P1-24	炭酸含有アパタイト骨補填材の破骨細胞分化に及ぼす影響 ○高橋 潤 ¹ , 川木 晴美 ² , 近藤 雄三 ¹ , 梅村 直己 ² , 神谷 真子 ³ , 高山 英次 ² , 田辺俊一郎 ¹ , 土井 豊 ⁴ , 永原 國央 ¹ , 近藤 信夫 ² (朝日大 歯 インプラント, ² 朝日大 歯 口腔生化, ³ 朝日大 経営 化学, ⁴ 朝日大 歯 理工)
P1-25	Neuropeptide Y Y1 受容体の阻害による MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化の誘導 ○箭原 元基 ¹ , 田村-辻 潔美 ² , 田村 正人 ² (北大 院歯 口腔顎顔面外科, ² 北大 院歯 口腔分子生化)
P1-26	代謝モニタリング・システムを用いた癌細胞の糖・アミノ酸代謝活性測定と代謝活性に対する環境 pH の影響 ○森島 浩允 ^{1,2} , 鷺尾 純平 ¹ , 北村 淳 ^{1,2} , 高橋 哲 ¹ , 高橋 信博 ¹ (東北大 院歯 口腔生化, ² 東北大 院歯 顎顔面口外)
P1-27	Surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラー抽出液のヒト歯髄由来幹細胞の動態におよぼす影響 ○石樽 大嗣 ^{1,2} , 川木 晴美 ² , 巽 勇介 ^{1,2} , 新谷 耕平 ^{1,2} , 梅村 直己 ² , 神谷 真子 ³ , 高山 英次 ² , 堀田 正人 ¹ , 近藤 信夫 ² (朝日大 歯 保存, ² 朝日大 歯 口腔生化, ³ 朝日大 経営 化学)
P1-28	長期使用義歯からの細菌由来揮発性代謝産物の検出 ○互野 亮 ¹ , 末永 華子 ² , 鷺尾 純平 ³ , 佐々木啓一 ¹ , 高橋 信博 ³ (東北大 院歯 口腔システム補綴, ² 東北大 院歯 予防歯科, ³ 東北大 院歯 口腔生化)
P1-29	ブタ幼若および成熟エナメル質中の TGF-β アイソフォームについて ○大久保水羽 ¹ , 小林 冴子 ² , 山本 竜司 ³ , 齊藤 まり ³ , 長野 孝俊 ¹ , 五味 一博 ¹ , 大井田新一郎 ³ , 山越 康雄 ³ (鶴大 歯 歯周, ² 鶴大 歯 小児歯, ³ 鶴大 歯 生化)
P1-30	ブタ幼若エナメル質中の TGF-β1 とエナメルタンパク質との相互作用について ○小林 冴子 ¹ , 山本 竜司 ² , 大井田新一郎 ² , 朝田 芳信 ¹ , 山越 康雄 ² (鶴大 歯 小児歯, ² 鶴大 歯 生化)
P1-31	Er:YAG レーザーによるブタ歯髄組織への影響について ○山川駿次郎 ¹ , 丹羽 堯彦 ² , 小林 一行 ³ , 山本 竜司 ⁴ , 細矢 哲康 ^{1,4} , 山越 康雄 ⁴ (鶴大 歯 歯内療法, ² 鶴大 歯 歯周病, ³ 鶴大短大 歯科衛生, ⁴ 鶴大 歯 分子生化)
P1-32	生理的乳歯歯根吸収組織の存在する TGF-β1 の発現と破歯細胞の分化誘導調節について ○島崎 絵美 ¹ , 唐木田丈夫 ² , 山本 竜司 ² , 朝田 芳信 ¹ , 山越 康雄 ² (鶴大 院歯 小児歯, ² 鶴大 歯 分子生化)
P1-33	Ameloblastin and enamelin regulate osteoclastogenesis by modifying RANKL expression via p38 and Erk1/2 MAPKs signalling pathways ○Chaweewannakorn Wichida ^{1,2} , 牧 憲司 ² , 有吉 渉 ¹ , 沖永 敏則 ¹ , 西原 達次 ¹ (九歯大 感染分子生物, ² 九歯大 口腔機能発達)
P1-34	インターロイキン-1β で刺激した軟骨細胞による NADPH-オキシダーゼに依存した細胞外マトリックスの分解 ○船登 咲映 ^{1,2} , 安原 理佳 ³ , 宮本 洋一 ¹ , 吉村健太郎 ¹ , 美島 健二 ³ , 馬場 一美 ² , 上條竜太郎 ¹ (昭大 歯 口腔生化, ² 昭大 歯 補綴, ³ 昭大 歯 口腔病態診断 口腔病理)
P1-35	W9 ペプチドのヒト破骨細胞分化抑制作用と骨芽細胞分化促進作用 ○中村美どり ^{1,2} , 小出 雅則 ² , 山下 照仁 ² , 小林 泰浩 ² , 高橋 直之 ² , 宇田川信之 ^{1,2} (松歯大 口腔生化, ² 松歯大 総歯研)
P1-36	生理活性物質を有する脱灰骨シートを用いたインプラント周囲の骨増生 ○白井 麻衣 ¹ , 山本 竜司 ² , 小松浩一郎 ³ , 下田 信治 ⁴ , 山越 康雄 ² , 大井田新一郎 ² (鶴大 歯 有床義歯補綴, ² 鶴大 歯 生化, ³ 鶴大 歯 薬理, ⁴ 鶴大 歯 解剖 1)
P1-37	口腔扁平上皮癌のグルコース代謝に対するジクロロ酢酸ナトリウム及び 2-デオキシ-D-グルコースの抑制効果 ○北村 淳 ^{1,2} , 鷺尾 純平 ¹ , 森島 浩允 ^{1,2} , 高橋 哲 ² , 高橋 信博 ¹ (東北大 院歯 口腔生化, ² 東北大 院歯 顎顔面口外)
P1-38	ヒト歯髄細胞における lipopolysaccharide による HIF1a 発現の誘導 ○藤井真由子, 川島 伸之, 興地 隆史 (医科歯科大 院医歯 歯髄生物)
P1-39	神経堤細胞分化誘導における発現遺伝子の解析 ○佐藤 彩乃 ¹ , 篠 宏美 ² , 小野寺晶子 ² , 齋藤 暁子 ² , 一戸 達也 ¹ , 東 俊文 ² (東歯大 院歯 麻酔, ² 東歯大 生化)
P1-40	ATDC5 細胞の軟骨分化におけるリゾリン脂質アシル転移酵素の働き ○田部 士郎 ^{1,2} , 引地 尚子 ³ , 有吉 渉 ¹ , 沖永 敏則 ¹ , 西原 達次 ¹ (九歯大 感染分子生物, ² 九歯大 顎顔面外科, ³ 九歯大 口腔保健)

P1-41	Tr1 分化における PI3 の役割 ○Niken Adiba Nadya, 東 みゆき, 永井 重徳 (医科歯科大 院医歯 分子免疫)
P1-42	Cariogenicity of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in dental cavity is promoted by biofilm acidification via extracellular electron transfer ○Naradasu Divya ¹ , 岡本 章玄 ² (¹ 東大 院工 先端学際工学, ² 物質・材料研究機構)
P1-43	成体マウスの切歯形成における TGF-β ファミリーの関与 ○町谷亜位子 ^{1,2} , 自見英治郎 ³ , 須田 直人 ² , 片桐 岳信 ¹ (¹ 埼玉医大 ゲノム 病態生理, ² 明海大 歯 矯正, ³ 九歯大 分子情報生化学)
P1-44	低分子量 G タンパク質 Cdc42 は PTH シグナルを介し胎生期および生後成長期の軟骨形成を制御している ○長濱 諒 ^{1,2} , 山田 篤 ¹ , 榎 宏太郎 ² , 上條竜太郎 ¹ (¹ 昭大 歯 口腔生化学, ² 昭大 歯 矯正)

モリタ賞 生理学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

P1-45	咀嚼刺激の低下は顎口腔組織の成長を抑制し記憶学習障害を誘発する ○福島由香乃 ^{1,2} , 小野 岳人 ¹ , 小野 卓史 ² , 中島 友紀 ^{1,3,4} (¹ 医科歯科大 院医歯 分子情報伝達, ² 医科歯科大 院医歯 咬合機能矯正, ³ 科学技術振興機構 さきがけ, ⁴ 日本医療研究開発機構 AMED-CREST)
P1-46	cadherin/catenin シグナルを介した MMP-20 のエナメル質形成制御機構 ○進 正史 ¹ , 岡本富士雄 ¹ , 鍛冶屋 浩 ¹ , 緒方佳代子 ¹ , 岡部 幸司 ¹ (¹ 福歯大 細胞生理, ² オハイオ州立大 歯 生物科学)
P1-47	新規歯肉血流計測技術の開発：ヒト歯肉微循環の加齢変化 ○大杉 侑子, 永嶋 義直, 中津 晋, 佐藤 佳昌, 千葉 厚子, 藤中 英剛, 矢納 義高, 仁木 佳文 (花王 パーソナルヘルスケア研)
P1-48	大気圧センサを用いた咽頭内圧測定システムによる嚥下機能の評価 ○長谷川真奈 ^{1,2} , 岡本圭一郎 ¹ , 黒瀬 雅之 ¹ , 山田 好秋 ³ , 藤井 規孝 ² , 山村 健介 ¹ (¹ 新潟大 院医歯 口腔生理, ² 新潟大 医歯病 歯総診, ³ 東歯大 口科研)
P1-49	急性歯髄炎により誘導される歯痛錯誤の末梢神経機構 ○古宮 宏記 ¹ , 篠田 雅路 ² , 岩田 幸一 ² , 小木曾文内 ¹ (¹ 日大 歯 保存 II, ² 日大 歯 生理)
P1-50	象牙芽細胞におけるアルカリ感受性 store-operated Ca ²⁺ entry (SOCE) ○木村 麻記, 佐藤 正樹, 小島 佑貴, 東川明日香, 陽田みゆき, 小倉 一宏, 望月 浩幸, 河野 恭佑, 田崎 雅和, 澁川 義幸 (東歯大 生理)
P1-51	矯正力負荷下の歯根膜刺激に対する大脳皮質の神経応答 ○堀貫 恵利 ^{1,2} , 清水 典佳 ¹ , 越川 憲明 ² , 小林 真之 ² (¹ 日大 歯 矯正, ² 日大 歯 薬理)
P1-52	セロトニンは 5-HT _{2A} 受容体を介して NMDA 受容体機能を調節し咬筋運動ニューロンのグルタミン酸応答を増大する ○壇辻 昌典 ¹ , 中村 史朗 ¹ , 中山希世美 ¹ , 望月 文子 ¹ , 清本 聖文 ¹ , 尾関 雅彦 ² , 井上 富雄 ¹ (¹ 昭大 歯 口腔生理, ² 昭大 歯 インプラント)
P1-53	2 型糖尿病モデルマウスにおける唾液分泌能の解析 ○宗政 翔 ¹ , 近藤 祐介 ¹ , 向坊 太郎 ¹ , 楠田優一郎 ¹ , 宮城 勇大 ¹ , 柄 慎太郎 ¹ , 正木 千尋 ¹ , 中本 哲自 ² , 細川 隆司 ¹ (¹ 九歯大 口腔再建リハ, ² 松歯大 補綴)
P1-54	下歯槽神経の再生過程における細胞接着分子の発現変化 ○鈴木 達郎 ¹ , 近藤 真啓 ² , 菅野 直之 ¹ , 岩田 幸一 ² , 佐藤 秀一 ¹ (¹ 日大 歯 保存 III, ² 日大 歯 生理)
P1-55	ラットの睡眠時開口反射活性の術後性変化 ○尾台-井出 令奈 ¹ , 安達 一典 ² , 渡部 茂 ¹ , 坂上 宏 ² (¹ 明海大 歯 小児歯, ² 明海大 歯 薬理)
P1-56	矯正ワイヤー誘発新規口内炎モデルにおける疼痛発症メカニズム ○伊藤 美紗 ¹ , 小野堅太郎 ¹ , 人見 涼露 ¹ , 野代 知孝 ¹ , 郡司掛香織 ² , 黒石加代子 ² , 川元 龍夫 ² , 稲永 清敏 ¹ (¹ 九歯大 歯 生理, ² 九歯大 歯 顎口腔機能矯正)
P1-57	ラット口内炎モデルに発症する口腔内疼痛に対するエンドセリン 1 の関与 ○野代 知孝 ^{1,2} , 人見 涼露 ¹ , 小野堅太郎 ¹ , 伊藤 美紗 ¹ , 正木 千尋 ² , 細川 隆司 ² , 稲永 清敏 ¹ (¹ 九歯大 生理, ² 九歯大 口腔再建リハ)
P1-58	2 型糖尿病ラット唾液腺における副交感神経性血管拡張反応 ○佐藤 寿哉, 石井 久淑 (北医療大 歯 生理)
P1-59	下歯槽神経損傷後の異所性疼痛に対するマクロファージの関与 ○Dulguun Batbold ¹ , 篠田 雅路 ¹ , 山口 聡 ² , 岩田 幸一 ¹ (¹ 日大 歯 生理, ² 医科歯科大 院医歯)
P1-60	Polphyromonas gingivalis 由来 LPS が心筋, 骨格筋に及ぼす影響 ○川村 直矢 ¹ , 大貫 芳樹 ² , 奥村 敏 ² , 五味 一博 ¹ , 氏家 優子 ¹ , 梅木 大輔 ³ , 伊藤 愛子 ³ (¹ 鶴大 歯 歯周病, ² 鶴大 歯 生理, ³ 鶴大 歯 矯正)
P1-61	味神経切断が塩酸キニーネに対する忌避行動に及ぼす影響 ○大木 誠, 三浦 裕仁, 齋藤 充 (鹿大 院医歯 口腔生理)

P1-62	気圧計の口腔機能計測への応用 ○平木 圭佑 ¹ , 山田 好秋 ² , 杉山 哲也 ¹ , 石田 瞭 ¹ (東歯大 院歯 健康科学, ² 東歯大 口科研)
P1-63	下歯槽神経切除後の顔面皮膚感覚機能回復に対する GDNF の有用性 ○渡辺 雅弘 ¹ , 篠田 雅路 ² , 菅野 直之 ¹ , 佐藤 秀一 ¹ , 岩田 幸一 ² (日大 歯 保存 III, ² 日大 歯 生理)

モリタ賞 組織・発生学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

P1-64	Cbfb1 と Cbfb2 アイソフォームは骨格形成過程において重要な役割を果たす ○姜 晴, 秦 昕, 小守 寿人, 松尾 友紀, 宮崎 敏博, 森石 武史, 小守 壽文 (長大 院医歯 細胞生物)
P1-65	Runx シグナリングは一次口蓋と二次口蓋の融合に Tgfb3 を介して関与している ○Sarper Safiye, 黒坂 寛, 三原 聖美, 青山 剛三, 山城 隆 (阪大 院歯 矯正)
P1-66	歯のエナメル上皮における RUNX1 と Cbfb は, マウスのエナメル質形成のために重要です ○Sarper Safiye ¹ , 三浦 治郎 ² , 山口 哲 ³ , 今里 聡 ³ , 森田 知里 ¹ , 山城 隆 ¹ (阪大 院歯 矯正, ² 阪大 総診, ³ 阪大 院歯 理工)
P1-67	Asporin は咬合機能低下に伴う新生歯槽骨添加を制御する ○糸日谷佳菜子 ¹ , 菅崎 弘幸 ¹ , 石川美佐緒 ² , 下田 信治 ² , 中村 芳樹 ¹ (鶴大 歯 矯正, ² 鶴大 歯 解剖 I)
P1-68	歯の矯正学的移動における歯槽骨リモデリング制御機構の解析 ○庄司あゆみ ^{1,2} , 小野 岳人 ¹ , 森山 啓司 ² , 中島 友紀 ^{1,3,4} (医科歯科大 院医歯 分子情報伝達, ² 医科歯科大 院医歯 顎顔面矯正, ³ 科学技術振興機構 さきがけ, ⁴ 日本医療研究開発機構 革新的先端研究開発支援事業)
P1-69	レチノイン酸シグナルと Shh シグナルの相互作用が顔面形成に及ぼす役割 ○Wang Qi, 山城 隆, 黒坂 寛 (阪大 院歯 矯正)
P1-70	病的に活性化された破骨細胞: 形成条件の検討と蛍光プローブを用いた骨吸収イメージング ○白鳥 卓麻 ^{1,3} , 久木田明子 ² , 上原 範久 ¹ , 久本由香里 ¹ , 張 旌旗 ¹ , 山座 孝義 ¹ , 古谷野 潔 ³ , 久木田敏夫 ¹ (九大 院歯 分子口腔解剖, ² 佐賀大 医 微生物, ³ 九大 院歯 インプラント)
P1-71	象牙質中の DSPP 由来タンパク質の加齢に伴う変化について ○丹羽 堯彦 ¹ , 長野 孝俊 ¹ , 五味 一博 ¹ , 山越 康雄 ² (鶴大 歯 歯周病, ² 鶴大 歯 生化)
P1-72	完全脱臼歯の歯周組織再生におよぼす保存液の影響に関する組織学的検討 ○Hasan Riasat ^{1,2} , 建部 廣明 ¹ , 入江 一元 ¹ , 斎藤 隆史 ² (北医療大 歯 組織, ² 北医療大 歯 う蝕制御治療)
P1-73	Substance P によるマウス骨芽細胞の骨形成に対する NK1 受容体ノックダウンの影響について ○豊留宗一郎 ^{1,2} , 倉本恵梨子 ¹ , 岩井 治樹 ¹ , 山中 淳之 ¹ , 吉村 卓也 ² , 中村 典史 ² , 後藤 哲哉 ¹ (鹿大 院医歯 機能形態, ² 鹿大 院医歯 顎顔面外科)
P1-74	ヒト乳歯幹細胞におけるビリルビン添加による細胞生存への影響 ○友田恵利佳 ^{1,2} , 山座 孝義 ¹ , 山座 治義 ² , 田中 陽介 ¹ , 園田聡一郎 ¹ , 野中 和明 ² , 久木田敏夫 ¹ (九大 院歯 分子口腔解剖, ² 九大 院歯 小児口腔)
P1-75	胎子マウス顎下腺の分枝形態形成における integrin $\beta 1$ subunit の役割 ○足立 圭亮 ¹ , 水越 堅司 ² , 小山 典子 ² , 村松 泰徳 ¹ , 柏保 正典 ² (朝日大 歯 口外, ² 朝日大 歯 薬理)
P1-76	マウス臼歯舌下移植後の歯髄治癒過程における IGF binding protein 5 の役割について ○斎藤浩太郎, 大島 勇人 (新潟大 院医歯 硬組織形態)
P1-77	抜歯痕修復における間葉系幹細胞の CD91 の機能的役割 ○二宮 禎 ¹ , 細矢 明宏 ² , 中村 浩彰 ² (松歯大 総歯研 硬組織, ² 松歯大 口腔解剖 II)
P1-78	OVA 喘息モデルマウスにおける機械的アロディニア ○曹 愛琳 ^{1,2} , 吉本 怜子 ³ , 合島怜央奈 ² , 張 旌旗 ¹ , 城戸 瑞穂 ² (九大 院歯 分子口腔解剖, ² 佐賀大 医 組織・神経解剖, ³ 九大 院歯 歯周)
P1-79	マウスメッセル軟骨におけるセプトクラストの局在 ○坂下 英 ^{1,2} , 坂東 康彦 ¹ , 崎山 浩司 ¹ , 天野 修 ¹ (明海大 歯 解剖, ² 明海大 歯 口腔顎顔面外科 II)
P1-80	基底膜分子 Nephronectin は EGF like repeat domain を介して歯原性上皮幹細胞の細胞増殖を制御する ○新井智映子 ¹ , 吉崎 恵悟 ¹ , 宮崎佳奈子 ¹ , 韓 雪 ¹ , 鮎田 啓太 ¹ , 福本 敏 ² , 高橋 一郎 ¹ (九大 院歯 矯正, ² 東北大 院歯 小児歯)
P1-81	組織透明化と神経トレース技術によるラット三叉神経節細胞の三次元的体部位局在の解析 ○千堂 良造 ^{1,2} , 岩井 治樹 ¹ , 倉本恵梨子 ¹ , 吉村 成美 ¹ , 山口 留奈 ¹ , 山中 淳之 ¹ , 豊留宗一郎 ^{1,3} , 杉村 光隆 ² , 後藤 哲哉 ¹ (鹿大 院医歯 機能形態, ² 鹿大 院医歯 歯科麻酔全身管理, ³ 鹿大 院医歯 顎顔面外科)
P1-82	移植骨髄由来細胞の口蓋膜への遊走と細胞分化 ○大谷友加里 ¹ , 玉村 亮 ¹ , 河野 哲朗 ¹ , 鈴木久仁博 ² , 中野 敬介 ³ , 長塚 仁 ³ , 辻極 秀次 ⁴ , 岡田 裕之 ¹ (日大 松戸歯 組織, ² 日大松戸歯 生物, ³ 岡大 院医歯薬 口腔病理, ⁴ 岡山理大 理 臨床生命科学 組織病態)
P1-83	唾液腺形態形成における筋上皮細胞の役割について ○井階 一樹, 小野 瞳, 阪井 丘芳 (阪大 院歯 顎治)

P1-84	マウス歯牙形成過程におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能 ○上運天太一 ¹ , 出野 尚 ² , 島田 明美 ² , 中村 芳樹 ¹ , 木村 宏 ³ , 立花 誠 ⁴ , 中島 和久 ² , 二藤 彰 ² (鶴大 歯 矯正, ² 鶴大 歯 薬理, ³ 東工大 院生命理工 生体システム, ⁴ 徳大 疾患酵素学研究会)
P1-85	機械刺激を負荷した歯根膜細胞による神経分化誘導機構の解明 ○高橋かおり, 吉田 卓史, 若森 実 (東北大 院歯 歯科薬理)
P1-86	癌細胞群を取り囲む正常細胞群の細胞骨格の解析 ○北河 憲雄, 大谷 崇仁, 稲井哲一朗 (福歯大 生体構造)
P1-87	歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への分化における Epiprotein と T-box1 の役割 ○酒井 陽 ^{1,3} , 吉崎 恵悟 ^{2,3} , 千葉 雄太 ³ , 池内 友子 ³ , 山本 朗仁 ¹ , 日比 英晴 ¹ , 山田 吉彦 ³ (名大 院医 顎顔面外科, ² 九大 院歯 矯正, ³ 米国立衛生研)

モリタ賞 微生物学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

P1-88	インプラント周囲炎と歯周炎における細菌叢メタトランスクリプトーム解析 ○渡辺 孝康 ¹ , 芝 多佳彦 ² , 加地 博一 ³ , 竹内 康雄 ² , 丸山 史人 ⁴ , 和泉 雄一 ² , 中川 一路 ⁴ (東大 院農生命 食の安全セ 食品病原微生物, ² 医科歯科大 院医歯 歯周病, ³ 医科歯科大 院医歯 顎顔面外科, ⁴ 京大 院医 微生物感染症)
P1-89	C1q との相互作用を介する化膿レンサ球菌の補体免疫回避機構 ○小川真理子, 住友 倫子, 毛利 泰士, 山口 雅也, 中田 匡宣, 川端 重忠 (阪大 院歯 口腔細菌)
P1-90	歯周病原細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> における短鎖脂肪酸分泌とジンジバイン産生機構の関連 ○佐藤 満成 ¹ , 吉田 康夫 ² , 永野 恵司 ² , 長谷川義明 ² , 武部 純 ¹ , 吉村 文信 ² (愛院大 歯 有床義歯, ² 愛院大 歯 微生物)
P1-91	齶蝕関連 <i>Bifidobacterium</i> の酸産生活性とそのフッ化物による抑制効果 ○馬目 歩実 ¹ , 安彦 友希 ^{2,3} , 川嶋 順子 ⁴ , 福本 敏 ¹ , 高橋 信博 ² (東北大 院歯 小児歯, ² 東北大 院歯 口腔生化, ³ 東北大 院歯 歯学イノベーションリエゾンセ, ⁴ 東北大 東北メディカルメガバンク 地域口腔健康)
P1-92	<i>Streptococcus mutans</i> における Fructanase の CSP 依存的 Quorum sensing への影響 ○鈴木 雄祐 ^{1,2} , 荒井 俊明 ^{1,3} , 小倉 直美 ² , 近藤 壽郎 ² , 泉福 英信 ¹ (国立感染症研 細菌一, ² 日大松戸歯 顎顔面外科, ³ 鶴大 歯 口外)
P1-93	分子シャペロン DnaK をターゲットにした低分子化合物を用いた新しいバイオフィルム阻害法の開発 ○有田(森岡) 健一 ¹ , 永尾 潤一 ² , 成田 由香 ² , 橋本麻利江 ² , 田崎 園子 ² , 池崎晶二郎 ² , 長 環 ² , 田中 芳彦 ² (福歯大 先端科学セ, ² 福歯大 感染生物)
P1-94	<i>Porphyromonas gingivalis</i> は補体 C5a と TLR を利用して免疫系から回避する ○前川 知樹 ¹ , 前田 健康 ¹ , 寺尾 豊 ² (新潟大 院医歯 高度口腔機能研セ, ² 新潟大 院医歯 微生物)
P1-95	アメロプラスチンによる炎症性サイトカイン産生増強メカニズムの解析 ○大塚 麻衣 ^{1,2} , 沖永 敏則 ¹ , 有吉 渉 ¹ , 北村 知昭 ² , 西原 達次 ¹ (九歯大 感染分子生物, ² 九歯大 保存)
P1-96	<i>Treponema denticola marR</i> 様遺伝子の機能解析 ○沼田 由美 ¹ , 柴山 和子 ² , 佐藤 亨 ¹ , 菊池有一郎 ² , 国分 栄仁 ² , 石原 和幸 ² (東歯大 クラウン補綴, ² 東歯大 微生物)
P1-97	アレルギーに関連した新しい T 細胞シグナル分子の機能解析 ○橋本麻利江 ^{1,2} , 永尾 潤一 ¹ , 田崎 園子 ¹ , 池崎晶二郎 ¹ , 成田 由香 ¹ , 有田(森岡) 健一 ¹ , 長 環 ¹ , 湯浅 賢治 ² , 田中 芳彦 ¹ (福歯大 機能生物化学 感染生物, ² 福歯大 診断・全身管理 画像診断)
P1-98	形質転換誘導性タンパク質 Ccs4 が <i>Streptococcus pneumoniae</i> の病原性に与える影響 ○広瀬雄二郎, 山口 雅也, 後藤 花奈, 住友 倫子, 中田 匡宣, 川端 重忠 (阪大 院歯 口腔細菌)
P1-99	口腔カンジダ症を制御する T 細胞応答の誘導 ○田崎 園子 ^{1,2} , 長 環 ¹ , 永尾 潤一 ¹ , 成田 由香 ¹ , 橋本麻利江 ¹ , 池崎晶二郎 ¹ , 有田(森岡) 健一 ¹ , 小島 寛 ² , 田中 芳彦 ¹ (福歯大 機能生物 感染生物, ² 福歯大 成長発達 障害歯)
P1-100	歯周病原菌に対する新規化合物の効果 ○藤原奈津美 ^{1,2} , 村上 圭史 ¹ , 湯本 浩通 ³ , 弘田 克彦 ¹ , 尾崎 和美 ² , 三宅洋一郎 ¹ (徳大 院医歯薬 口腔微生物, ² 徳大 院医歯薬 口腔保健支援, ³ 徳大 院医歯薬 保存)
P1-101	マクロファージ分化における ω -3 系脂肪酸の役割 ○川野 亜希 ^{1,2} , 沖永 敏則 ² , 引地 尚子 ¹ , 有吉 渉 ² , 西原 達次 ² (九歯大 口腔保健管理, ² 九歯大 感染分子生物)
P1-102	<i>Streptococcus sanguinis</i> の IL-1 α 産生誘導活性におけるインフラマソームの関与 ○佐伯 歩 ¹ , 長谷部 晃 ¹ , 亀崎 良助 ¹ , 鈴木 敏彦 ² , 柴田健一郎 ¹ (北大 院歯 口腔分子微生物, ² 医科歯科大 院医歯 細菌感染)
P1-103	A 群レンサ球菌の PI3K/Akt 活性化因子を介した咽頭上皮細胞株への付着・侵入メカニズムの解析 ○黒澤 美絵 ^{1,2} , 小田 真隆 ¹ , 土門 久哲 ¹ , 齊藤 一誠 ² , 早崎 治明 ² , 寺尾 豊 ¹ (新潟大 院医歯 微生物, ² 新潟大 院医歯 小児歯)
P1-104	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> DNA によるインフラマソームの活性化 ○亀崎 良助 ^{1,2} , 佐伯 歩 ¹ , 長谷部 晃 ¹ , 北川 善政 ² , 鈴木 敏彦 ³ , 柴田健一郎 ¹ (北大 院歯 口腔分子微生物, ² 北大 院歯 口腔診断内科, ³ 医科歯科大 院医歯 細菌感染)

P1-105	タイ児童舌苔から分離された <i>Veillonella</i> 属新菌種の塩基配列解析 ○眞島いつみ ^{1,2} , Theodorea Citra ² , 中澤 太 ² (学振 特別研究員 PD, ² 北医療大 歯 微生物)
P1-106	<i>Candida albicans</i> のバイオフィルム形成における mild heat stress の影響 ○池崎晶二郎 ¹ , 長 環 ¹ , 田崎 園子 ¹ , 橋本麻利江 ¹ , 成田 由香 ¹ , 永尾 潤一 ¹ , 有田 (森岡) 健一 ¹ , 池邊 哲郎 ² , 田中 芳彦 ¹ (福歯大 機能生物 感染生物, ² 福歯大 口外)
P1-107	侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼの酵素反応の解析 ○安部 佐, 河原井武人, 高橋 幸裕, 古西 清司 (日歯大 生命歯 微生物)
P1-108	タイ児童の口腔清掃状態と唾液中のペイオネラ属細菌種の分布と出現頻度 ○Theodorea Citra ^{1,2} , 眞島いつみ ^{1,3} , 中澤 太 ¹ (北医療大 歯 微生物, ² インドネシア大 歯 口腔生物, ³ 学振 特別研究員 PD)
P1-109	マウス唾液腺樹状細胞の同定とその免疫学的特徴の解析 ○陸 路 ^{1,2} , 田中 志典 ^{2,3} , 菅原 俊二 ² (東北大 院歯 口診, ² 東北大 院歯 口腔分子制御, ³ 東北大 院歯 小児歯)
P1-110	乳幼児期における口腔常在細菌叢の変化と影響を与える要因の検討 ○朝川美加李, 竹下 徹, 影山 伸哉, 山下 喜久 (九大 院歯 口腔予防)
P1-111	唾液マイクロバイオームは歯周病の重症度を反映する ○影山 伸哉, 竹下 徹, 朝川美加李, 柴田 幸江, 山下 喜久 (九大 院歯 口腔予防)
P1-112	口腔粘膜炎症において局所に集積する T 細胞の解析 ○Hirunwidchayarat Worawalun, 大野 建州, Kang Siwen, 永井 重徳, 東 みゆき (医科歯科大 院医歯 分子免疫)
P1-113	<i>Candida albicans</i> に対する口腔プロバイオティクス候補菌の有効成分の検討 ○小島由佳子, 大島 朋子, 河井 智美, 前田 伸子 (鶴大 院歯 微生物)
P1-114	小児プラークにおけるミュータンスレンサ球菌定着量と齲蝕罹患率の関連 ○蒔苗 剛 ¹ , 下山 佑 ² , 田中 光郎 ¹ , 石河 太知 ² , 古玉 芳豊 ² , 佐々木 実 ² , 根本 優子 ³ , 根本 孝幸 ³ , 木村 重信 ⁴ (岩医大 歯 小児・障害者, ² 岩医大 歯 分子微生物, ³ 長大 院医歯薬 口腔生化, ⁴ 関西女子短大 歯 科衛生)

モリタ賞 病理学・・

P1-115	吸収性縫合糸に対するラット皮下組織の反応 ○中安 喜一 ¹ , 松田紗衣佳 ¹ , 正村 正仁 ² , 大須賀直人 ² , 川上 敏行 ¹ (松歯大 院 病態解析, ² 松歯大 院 口腔健康分析)
P1-116	口腔扁平上皮癌細胞由来エクソソームによる細胞間クロストークと病態形成 ○森岡 政彦 ^{1,2} , 川久保-安河内 友世 ² , 中村 誠司 ¹ (九大 院歯 顎顔面腫瘍制御, ² 福岡大 薬 免疫・分子治療)
P1-117	口腔扁平上皮癌における kallikrein related peptidase 6 の発現と機能に関する研究 ○金子 直樹, 川野真太郎, 橋口 有真, 中村 誠司 (九大 口腔顎顔面外科)
P1-118	歯原性腫瘍におけるメラニン沈着について ○磯村まどか ¹ , 佐藤 伸明 ¹ , 河合 遼子 ¹ , 神野 正人 ¹ , 本田 由馬 ¹ , 鳥井 康義 ¹ , 吉田 和加 ^{1,2} , 杉田 好彦 ^{1,2} , 久保 勝俊 ^{1,2} , 前田 初彦 ^{1,2} (愛院大 歯 口腔病理, ² 愛院大 未来口腔医療セ)
P1-119	認知症モデルマウスにおける唾液中の認知機能マーカーの探索 ○東 雅啓 ¹ , 杉本 昌弘 ^{2,3} , 猿田 樹理 ⁴ , 山本 裕子 ⁵ , 松尾 雅斗 ¹ , 槻木 恵一 ² (神歯大 院歯 口腔科学 歯科形態, ² 神歯大 院歯 口腔科学 環境病理・口腔病理診断, ³ 慶應大 先端生命科学研, ⁴ 神歯大 院歯 口腔科学 唾液腺健康医学, ⁵ 神歯大 短期 歯科衛生)
P1-120	ヒト口腔癌細胞株における TRP チャネルの機能解析 ○合島怜央奈 ^{1,2} , 吉本 怜子 ³ , 曹 愛琳 ^{1,4} , 森 啓輔 ² , 張 旌旗 ⁴ , 大崎 康吉 ⁴ , 檀上 敦 ² , 山下 佳雄 ² , 清島 保 ³ , 城戸 瑞穂 ¹ (佐賀大 医 組織神経解剖, ² 佐賀大 医 歯科口腔外科, ³ 九大 院歯 口腔病理, ⁴ 九大 院歯 分子口腔解剖)
P1-121	多段階癌抑制分子のケモカイン CXCL14/BRAK は扁平上皮組織の分化制御分子か？ ○生駒 丈晴 ¹ , 陽 暁艶 ^{2,3} , 小澤 重幸 ¹ , 前畑洋次郎 ² , 畑 隆一郎 ^{2,3} (神歯大 院 顎顔面外科, ² 神歯大 院 口腔科学, ³ 神歯大 院 口腔難治疾患研)
P1-122	ユビキチン・プロテアソーム系による染色体パッセンジャー複合体タンパク質 Borealin の発現制御機構とその意義 ○常松 貴明, 工藤 保誠, 山田安希子, 新垣理恵子, 石丸 直澄 (徳大 院医歯薬 口腔分子病態)
P1-123	口腔扁平上皮癌における miR-205 の発現と機能に関する研究～特に ΔNp63 との関連について～ ○橋口 有真, 川野真太郎, 金子 直樹, 中村 誠司 (九大 院歯 顎顔面腫瘍制御)
P1-124	<i>P.gingivalis</i> 歯性感染による NASH 病態進行における TLR2 の役割 ○古庄 寿子, 長崎 敦洋, 宮内 睦美, 高田 隆 (広大 院医歯薬保 口腔顎顔面病理病態)
P1-125	口腔扁平上皮癌において Gli 阻害剤 (GANT61) は細胞死を誘導する ○三上友理恵 ¹ , 永田 健吾 ² , 和田 裕子 ² , 藤井 慎介 ² , 安部みさき ³ , 吉本 怜子 ² , 清島 保 ² , 中村 誠司 ¹ (九大 院歯 顎顔面腫瘍制御, ² 九大 院歯 口腔病理, ³ 九大 院歯 口腔顎顔面外科)

P1-126	アレコリンによる歯肉上皮細胞での DNA 異常メチル化について ○Adhikari Bhoj Raj ¹ , 植原 治 ² , 清水 綾 ¹ , 平井 大地 ¹ , 森川 哲郎 ¹ , Neopane P ¹ , 高井 理衣 ³ , 佐藤 惇 ¹ , 西村 学子 ¹ , 安彦 善裕 ¹ (¹ 北医療大 歯 臨床口腔病理, ² 北医療大 歯 保健衛生, ³ 北医療大 歯 小児歯)
P1-127	エピジェネティクス修飾を受けたマラッセ上皮様細胞における幹細胞マーカーの発現上昇 ○吉田 光希 ¹ , 森川 哲郎 ¹ , Adhikari Bhoj Raj ¹ , 原田 文也 ¹ , 中條 貴俊 ¹ , 植原 治 ² , 佐藤 惇 ¹ , 西村 学子 ¹ , 齊藤 正人 ³ , 安彦 善裕 ¹ (¹ 北医療大 歯 臨床口腔病理, ² 北医療大 歯 保健衛生, ³ 北医療大 歯 小児歯)

モリタ賞 薬理学

P1-128	17 α -estradiol は GPR30-SPAK-KCC2 シグナル伝達を制御し興奮性 GABA を是正する ○塚原 飛央 ¹ , 古川みなみ ² , 佐藤 友明 ¹ (¹ 鹿大 院医歯 応用薬理, ² 鹿大 院医歯 矯正)
P1-129	NR4A1 に着目した薬物性歯肉増殖症のメカニズム解明の研究 ○岡信 愛, 松田 真司, 加治屋幹人, 藤田 剛, 栗原 英見 (¹ 広大 院医歯薬保 歯周)
P1-130	致死性低ホスファターゼ症モデルマウスに対する新規 TNALP 高発現遺伝子治療による硬組織石灰化不全の改善と延命効果 ○高橋 有希 ^{1,3} , 池上 良 ² , 平井 幸彦 ³ , 笠原 正貴 ¹ (¹ 東歯大 薬理, ² 東歯大 クラウン補綴, ³ 日医大 生化・分子生物)
P1-131	Mg, Ca 及び Zn で活性化されるヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ活性に対するエチドロネートの作用 ○島田 英知 ¹ , 鈴木 邦明 ² , 吉村 善隆 ² , 南川 元 ² , 山崎 裕 ¹ (¹ 北大 院歯 高齢者, ² 北大 院歯 細胞分子薬理)
P1-132	<i>Porphyromonas gingivalis</i> 由来 LPS による Th17 細胞への分化誘導におけるカテプシン S の役割 ○出来田雅人 ^{1,2} , 武 洲 ² , 中西 博 ² , 高橋 一郎 ¹ (¹ 九大 院歯 矯正, ² 九大 院歯 口腔機能分子)
P1-133	口腔癌細胞増殖抑制における抗体付着マイクロバブルと超音波との相乗作用 ○平林 文香 ^{1,2} , 岩永賢二郎 ² , 沖永 敏則 ¹ , 有吉 渉 ¹ , 西原 達次 ¹ (¹ 九歯大 感染分子生物, ² 九歯大 顎顔面外科)
P1-134	破骨細胞分化はラクトフェリンにより直接的に減弱される ○吉村 善隆 ¹ , 加藤 展教 ^{1,2} , 南川 元 ¹ , 鈴木 邦明 ¹ , 山崎 裕 ² (¹ 北大 院歯 細胞分子薬理, ² 北大 院歯 高齢者)
P1-135	レミフェンタニルの投与が兔の内頸動脈血流量と口腔組織血流量の変化に及ぼす影響 ○平田 淳司 ¹ , 笠原 正貴 ² , 一戸 達也 ³ (¹ 東歯大 院歯 麻酔, ² 東歯大 薬理, ³ 東歯大 麻酔)
P1-136	ラットエナメル芽細胞とマウス骨芽細胞の分化誘導に対するリコンビナント・ヒトアメロジェニンの作用 ○高橋亜友美 ¹ , 森田 貴雄 ² , 村田 佳織 ¹ , 齊藤 正人 ¹ , 谷村 明彦 ² (¹ 北医療大 歯 小児歯, ² 北医療大 歯 薬理)
P1-137	矯正治療に伴う疼痛に対する新規疼痛制御物質の探索 ○長谷川尚哉 ¹ , 佐々木 会 ¹ , 土屋 隆子 ¹ , 坂上 宏 ² , 安達 一典 ² , 須田 直人 ¹ (¹ 明海大 歯 形態機能成育 矯正, ² 明海大 歯 病態診断治療 薬理)
P1-138	ラット歯原性上皮細胞の分化とマイグレーションにおけるカルシウム応答の解析 ○村田 佳織 ¹ , 福本 敏 ³ , 森田 貴雄 ² , 高橋亜友美 ¹ , 齊藤 正人 ¹ , 谷村 明彦 ² (¹ 北医療大 歯 小児歯, ² 北医療大 歯 薬理, ³ 東北大 院歯 小児歯)
P1-139	皮膚と口腔粘膜におけるフィラグリンの発現様式および分解過程 ○有田 晴一 ¹ , 八田 光世 ² , 笠 孝成 ¹ , 坂上 竜資 ¹ , 山崎 純 ² (¹ 福歯大 口腔治療 歯周, ² 福歯大 細胞分子生物 分子機能)
P1-140	RANKL 結合ペプチド(OP3-4)の注射投与は, BMP-2 により誘導されるマウス上顎の骨造成を促進する ○上原 智己 ¹ , 田村 幸彦 ² , 宮新美智世 ¹ , 青木 和広 ² (¹ 医科歯科大 院医歯 小児歯, ² 医科歯科大 院医歯 硬組織薬理)
P1-141	口腔乾燥治療薬の継続服用による有効性の検討 ○小野 瞳, 井階 一樹, 阪井 丘芳 (¹ 阪大 院歯 顎治)

学生ポスター

PS-1	組織透明化によるマウス三叉神経中脳核回路の三次元解析 ○山口 留奈 ¹ , 吉村 成美 ¹ , 千堂 良造 ^{1,2} , 倉本恵梨子 ¹ , 岩井 治樹 ¹ , 山中 淳之 ¹ , 豊留宗一郎 ^{1,2} , 後藤 哲哉 ¹ (¹ 鹿大 院医歯 機能形態, ² 鹿大 院医歯 歯科麻酔全身管理, ³ 鹿大 院医歯 顎顔面外科)
PS-2	<i>Fusobacterium nucleatum</i> によるヒト好中球からの neutrophil extracellular traps 誘導 ○沼崎 研人 ¹ , 西岡 貴志 ² , 松下 健二 ³ , 多田 浩之 ¹ (¹ 東北大 院歯 口腔微生物, ² 東北大 院歯 口診, ³ 長寿セ 口腔疾患)
PS-3	健常者の唾液亜鉛イオン濃度と他の唾液マーカーとの関係性について ○秦 史子 ¹ , 葛城 啓彰 ² (¹ 日歯大新潟 3 年, ² 日歯大新潟 微生物)
PS-4	唾液腺再生モデルにおけるサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素 PACE4 の発現誘導-Part II- ○嶋谷 達哉 ^{1,2} , 嶺岸 誠 ^{1,3} , 赤松 徹也 ^{1,4} , 姚 陳娟 ¹ , 長谷川敬展 ¹ , 吉村 弘 ¹ (¹ 徳大 院医歯薬 口腔分子生理, ² 徳大 歯 4 年, ³ 徳大 歯 6 年, ⁴ 徳大 院生物資源産業 生体分子機能)

PS-5	ムスカリン受容体を介するカルシウム応答に対する局所麻酔薬の抑制作用とその作用機序 ○島谷 真梨, 岩田 采奈, 根津 顕弘, 谷村 明彦 (北医療大 歯 薬理)
PS-6	新規組織透明化技術による歯および歯周組織の立体構造解析 ○関 有里, 石田 成美, 谷村 明彦 (北医療大 歯 薬理)
PS-7	II型糖尿病モデル SDT fatty ラットにおける下顎骨歯周組織の組織化学的検索 ○吉田 泰士 ¹ , 本郷 裕美 ² , 坪井香奈子 ² , 長谷川智香 ² , 網塚 憲生 ² (1北大 歯 3年, 2北大 院歯 硬組織発生)
PS-8	ブタ幼若エナメル質中のアメロゲニン・TGF-β1 複合体と TGF-β 受容体との結合能について ○野田 千尋 ¹ , 藤浪さをり ¹ , 山本 竜司 ² , 小林 冴子 ³ , 大井田新一郎 ² , 山越 康雄 ² (1鶴大 歯 4年, 2鶴大 歯 分子生化学, 3鶴大 歯 小児歯)
PS-9	マウスの歯胚における Hey1 および Hey2 遺伝子発現の定量的解析 ○木部 琴乃 ¹ , 中富 満城 ² , 片岡 真司 ² , 豊野 孝 ² , 瀬田 祐司 ² (1九歯大 5年, 2九歯大 解剖)
PS-10	c-fos 遺伝子欠損マウスの骨細胞における微細構造学的検索 ○阿部 未来 ¹ , 長谷川智香 ² , 山本知真也 ² , 土屋恵李佳 ² , 宇田川信之 ³ , 網塚 憲生 ² (1北大 歯, 2北大 院歯 硬組織発生, 3松歯大 口腔生化学)
PS-11	マウスの“社会的”時差ボケ ○中西祐一郎 ^{1,2} , 草野慎之介 ^{1,2} , 高須 奈々 ^{2,3} , 中村 渉 ² (1阪大 歯, 2阪大 院歯 口腔時間生物, 3日本学術振興会 (RPD))
PS-12	視交叉上核の概日リズム位相後退が引き起こす“社会的”時差ボケ ○草野慎之介 ^{1,2} , 中西祐一郎 ^{1,2} , 高須 奈々 ^{2,3} , 中村 渉 ² (1阪大 歯, 2阪大 院歯 口腔時間生物, 3日本学術振興会 (RPD))
PS-13	無血清培地にて培養したヒト歯髓細胞の特性の解析 ○加藤 美咲 ¹ , 大谷 憲司 ² , 濱村 和紀 ³ , 本田 雅規 ¹ (1愛院大 歯 口腔解剖, 2株式会社再生医療推進機構, 3愛院大 歯 薬理)

8月26日(金) 15:40~16:40 ポスター会場

解剖・・

P2-1	下顎舌側領域における顎舌骨筋および静脈分布の関係 ○崎山 浩司, 坂東 康彦, 小峰 雄介, 三宅 言輝, 平良芙蓉子, 坂下 英, 天野 修 (明海大 歯 解剖)
P2-2	聴覚器官サイズが咬筋内部構造に与える影響～砂漠生齧歯類を用いた検討～ ○佐藤 和彦, 矢野 航, 渡邊 竜太, 江尻 貞一 (朝日大 歯 口腔解剖)
P2-3	マウス胎生期と出生直後の咀嚼筋発育における Tenomodulin の発現について ○佐藤 巖, 三輪 容子, 我妻 由梨, 春原 正隆 (日歯大 生命歯 解剖1)
P2-4	胎児期のエタノール曝露は大脳皮質のミクログリアの活性異常に因る形態異常と行動異常を誘発する ○駒田 致和 ¹ , 長尾 哲二 ² , 池田やよい ¹ (1愛院大 歯 解剖, 2近大 理工 生命科学)
P2-5	新規 Cre マウスを用いた TRPS において多彩な先天性心奇形がみられる原因解析 ○Nomir Ahmed ^{1,2} , 竹内 優斗 ^{1,3} , 藤川 順司 ^{1,4} , 阿部 真士 ¹ , 脇坂 聡 ¹ (1阪大 院歯 口腔解剖1, 2ダマンフル大 獣医学 解剖, 3阪大 院歯 矯正, 4阪大 歯病 障害歯)

歯牙・歯髓・・

P2-6	フィジー共和国住民の上顎第一小臼歯サイズにおける性的二型について ○佐々木佳世子, 近藤信太郎 (日大松戸歯 解剖)
P2-7	Guaiacol は三叉神経節ニューロンに作用し鎮痛効果を発揮する ○嶋田みゆき, 木村 麻記, 佐藤 正樹, 東川明日香, 小島 佑貴, 田崎 雅和, 澁川 義幸 (東歯大 生理)
P2-8	ブタ歯髓細胞の不死化と象牙芽細胞分化に及ぼす BMP2 と TGFβ の影響 ○唐木田丈夫, 大井田新一郎, 山本 竜司, 齊藤 まり, 山越 康雄 (鶴大 歯 生化学)
P2-9	象牙芽細胞の感覚受容機能発現に関する発生学的研究—第一報— ○田中 亜生, 澁川 義幸, 石川 昂, 田崎 雅和, 山本 仁, 新谷 誠康 (東歯大 小児歯)
P2-10	象牙質コラーゲン中の架橋型 AGEs の検出 ○清水 真人, 三浦 治郎 (阪大 院歯 総診)

P2-11	硬骨魚類スポッテドガーの顎歯エナメロイドでのエナメルタンパク様タンパクの出現と局在 ○笹川 一郎 ¹ , 横須賀宏之 ² , 石山巳喜夫 ² , 三上 正人 ³ (¹ 日歯大新潟 先端研セ, ² 日歯大新潟 解剖2, ³ 日歯大新潟 微生物)
P2-12	ヒト iPS 細胞から分化誘導させた神経堤細胞の特性 ○鳥海 拓 ¹ , 河野 英輔 ² , 磯川桂太郎 ¹ , 本田 雅規 ³ (¹ 日大 歯 解剖II, ² 日大 院歯, ³ 愛院大 歯 口腔解剖)

歯周組織

P2-13	歯根膜線維芽細胞による破骨細胞制御機能に及ぼす咬合力の影響 ○高橋 智美, 滝田 裕子, 牛島 夏未, 飯塚 正 (北大 院歯 学術支援)
P2-14	破骨細胞形成に対する脂質異常の影響 ○大城希美子 ¹ , 鍛冶屋 浩 ² , 岡本富士雄 ² , 坂上 竜資 ¹ , 岡部 幸司 ² (¹ 福歯大 口腔治療, ² 福歯大 細胞分子生物)
P2-15	多孔質性カルシウム製材に浸透させた新規合成ペプチドの動態 ○富永 和也 ¹ , 竹内 友規 ² , 本田 秀太 ² , 岡村 友玄 ¹ , 和唐 雅博 ¹ , 西川 哲成 ³ , 田中 昭男 ¹ (¹ 大歯大 口腔病理, ² 大歯大 院歯 病理, ³ 大歯大 歯医学教育開発)
P2-16	咬合性外傷時の歯周組織における幹細胞関連ケモカイン SDF-1 と CXCR4 の発現相関 ○後藤加寿子 ¹ , 鍛冶屋 浩 ² , 堤 貴司 ³ , 岡部 幸司 ² (¹ 福岡医短 歯科衛生, ² 福歯大 細胞分子生物 細胞生理, ³ 福歯大 咬合修復 有床義歯)
P2-17	Advanced Platelet-rich fibrin (A-PRF) を用いた歯槽骨再生療法の微小循環変化について ○松尾 雅斗, 奥寺 俊允, 山本 麗子, 東 雅啓 (神歯大 口腔科学 歯科形態)
P2-18	Advanced Platelet-rich fibrin (A-PRF) を用いた歯槽骨再生療法の組織学的研究 ○奥寺 俊允 ¹ , 東 雅啓 ¹ , 三好代志子 ² , 高垣 裕子 ² , 山本 麗子 ¹ , 松尾 雅斗 ¹ (¹ 神歯大 院歯 口腔科学・歯科形態, ² 神歯大 院歯 口腔科学)
P2-19	hPDL 細胞中の内在性 TGF-β に対する Er:YAG レーザーの照射効果 ○小林 一行 ¹ , 丹羽 堯彦 ² , 山川駿次郎 ³ , 齊藤 まり ⁴ , 山本 竜司 ⁴ , 山越 康雄 ¹ (¹ 鶴大短大 歯科衛生, ² 鶴大 歯 歯周病, ³ 鶴大 歯 歯内療法, ⁴ 鶴大 歯 生化)
P2-20	ナトリウム依存性リン酸共輸送担体 (Pit-1, Pit-2) はヒト歯根膜線維芽細胞の石灰化物形成に必須である ○石川美佐緒 ¹ , 糸日谷佳菜子 ² , 高野 吉郎 ² , 中村 芳樹 ² , 下田 信治 ¹ (¹ 鶴大 歯 口腔解剖, ² 鶴大 歯 矯正)
P2-21	ヒト肉線維芽細胞への S-PRG フィラー溶出液を用いた実験における至適濃度の検討 ○井上 博 ¹ , 合田 征司 ² , 西川 泰央 ¹ (¹ 大歯大 生理, ² 神歯大 院歯 口腔科学)
P2-22	Wheat Germ Agglutinin (WGA) によるヒト歯根膜線維芽細胞由来オキシタラン線維の検出の検討 ○鴨頭奈央子 ¹ , 藤田 隆寛 ¹ , 中島 一記 ¹ , 松田 裕子 ¹ , 畠山 純子 ³ , 畠山 雄次 ² , 沢 禎彦 ² , 石川 博之 ¹ (¹ 福歯大 矯正, ² 福歯大 機能構造, ³ 福歯大 保存)

唾液・唾液腺

P2-23	マウス胎仔唾液腺の発生過程における転写共役因子 YAP の分子機能解析 ○北川 道憲, 廣野 力, 杉田 誠 (広大院医歯薬保 口腔生理)
P2-24	EGF/ErbB/ERK は Shh/Ptch/Gli システムを介して顎下腺の分枝形態形成を調節する ○水越 堅詞, 小山 典子, 柏俣 正典 (朝日大 歯 薬理)
P2-25	Cdc42-PAK 経路を介した管腔臓器の維持 ○設楽 彰子 (米国立衛生研)
P2-26	マウス顎下腺の顆粒性導管に存在するピラー細胞の機能的解析 ○野中 直子, 中村 雅典 (昭大 歯 口腔解剖)
P2-27	唾液腺再生過程で見られる雌雄差について ○赤松 徹也 ^{1,2} , 姚 陳娟 ¹ , 長谷川敬展 ¹ , 吉村 弘 ¹ (¹ 徳大 院医歯薬 口腔分子生理, ² 徳大 院生物資源産業 生体分子機能)
P2-28	傷害側唾液腺と非傷害側唾液腺における相互作用 ○横山 愛, 加藤 治, 吉垣 純子 (日大松戸歯 生理)
P2-29	唾液腺マイクロ RNA の発現調節: 更年期後のストレスのバイオマーカーとしての可能性 ○栗原 琴二, 村本 和世 (明海大 歯 生理)
P2-30	ピロカルピンの前投与による唾液分泌亢進と遺伝子発現変化 ○森田 貴雄, 根津 顕弘, 谷村 明彦 (北医療大 歯 薬理)

P2-31	液状飼料飼育が成長期ラット顎下腺・舌下腺の腺房細胞に与える影響について ○高橋 茂 ¹ , 上北 広樹 ² , 谷脇 裕人 ¹ , 井上貴一郎 ¹ , 土門 卓文 ¹ (1北大 院歯 口腔機能解剖, 2北大 院歯 冠橋義歯補綴)
P2-32	うま味刺激により誘導される小唾液腺唾液分泌の日内変動 ○古山 昭, 大須賀謙二, 川合 宏仁 (奥羽大 歯 口腔機能分子生物)
P2-33	SNARE ノックアウト HAP1 細胞における遺伝子発現解析—SNAP23, Syntaxin4, Syntaxin2 KO の比較 ○荒川 俊哉 ¹ , Nattakarn Hosiriluck ^{1,2} , 岡山 三紀 ² , 溝口 到 ² , 田隈 泰信 ¹ (1北医療大 歯 生化, 2北医療大 歯 矯正)
P2-34	フラクトオリゴ糖がラット唾液 IgA 分泌速度の継時的変化に与える影響 ○山本 裕子 ¹ , 東 雅啓 ² , 猿田 樹理 ² , 槻木 恵一 ² (1神歯大 短大 歯科衛生, 2神歯大 院 口腔科学)
P2-35	唾液ヒスタチンとペプチドグリカンの結合による Toll 様受容体 2 シグナルへの影響 ○今村 泰弘 ¹ , 王 宝禮 ² , 十川 紀夫 ¹ (1松歯大 歯科薬理, 2大歯大 細菌)
P2-36	非肥満型糖尿病(NOD)マウスおよびヒト唾液に含まれる抗菌性タンパク質 Bpifb1 の二次元電気泳動解析 ○佐藤 律子 ^{1,2} , 梨田 智子 ² , 水橋 史 ³ , 吉村 建 ⁴ , 下村-黒木 淳子 ⁵ (1日歯大新潟短大 歯科衛生, 2日歯大新潟生化, 3日歯大新潟 補綴 1, 4日歯大新潟 解剖 1, 5日歯大新潟 小児歯)
P2-37	ラット耳下腺分泌顆粒と未成熟顆粒間における LC-MS 脂質解析 ○加藤 治, 横山 愛, 吉垣 純子 (日大松戸歯 生理)
P2-38	睡眠中の口腔内唾液 pH モニタリング ○中村 昭博, 渡辺 泰平, 中村 徳三, 雀部 貴志, 渡辺 幸嗣, 渡部 茂 (明海大 歯 小児歯)

再生・発生

P2-39	マウス顎顔面領域におけるリンパ管発生 ○田谷 雄二, 白子 要一, 佐藤かおり, 添野 雄一 (日歯大 生命歯 病理)
P2-40	マウス胚子の顎顔面形態形成における顔面突起の fusion と merging の差異に関する研究 ○杉山 明子, 滝川 俊也, 河野 芳朗 (朝日大 歯 口腔解剖)
P2-41	顔面発生時の神経堤細胞における恒常的 BMP シグナル活性化の影響 ○戸田 雅子, 岡 暁子, 尾崎 正雄 (福歯大 小児歯)
P2-42	コンドロイチン硫酸は頭蓋顔面形態形成を制御している ○依田 浩子 ¹ , 森田 航 ² , 柴田 俊一 ³ , 大島 勇人 ¹ (1新潟大 院医歯 硬組織形態, 2北大 院歯 口腔機能解剖, 3医科歯科大 院医歯 顎顔面解剖)
P2-43	ラット胚における外胚葉-内胚葉のオーラップ層の頭蓋顔面の器官の発生開始への寄与 ○今井 元 ¹ , 鈴木 礼子 ² (1奥羽大 歯 生物, 2奥羽大 歯 歯科薬理)
P2-44	舌筋パターンニングにおける Shh シグナル ○奥原 滋, 井関 祥子 (医科歯科大 院医歯 分子発生)
P2-45	歯髄幹細胞クローン間における分化能および増殖能と細胞周期関連遺伝子の発現解析 ○小林 朋子, 鳥居 大祐, 筒井 健夫 (日歯大 生命歯 薬理)
P2-46	Crouzon 症候群患者に由来する歯髄幹細胞の特性解析 ○鳥居 大祐, 松井美紀子, 小林 朋子, 筒井 健夫 (日歯大 生命歯 薬理)
P2-47	象牙芽細胞における Nestin 遺伝子の発現制御機構 ○中富 満城 ¹ , Quispe-Salcedo Angela ² , 依田 浩子 ² , 大島 勇人 ² (1九歯大 解剖, 2新潟大 院医歯 硬組織形態)
P2-48	スフェロイド形成による骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化誘導 ○中塚美智子 ¹ , 細矢 明宏 ² , 隈部 俊二 ¹ , 田村 功 ¹ (1大歯大 歯 口腔解剖, 2松歯大 歯 口腔解剖 II)
P2-49	Effect of the functional appliance on the condyle growth in rats ○朱 成淑 ¹ , Kim Ji-Youn ¹ , Owtad Payam ² , Park Jae Hyun ² , Shin Je-Won ¹ (1慶熙大 歯科大 口腔解剖, 2嘉泉大 保健科学大 歯科衛生)

骨・軟骨・骨代謝

P2-50	オステオネクチンは AP-1 活性を抑制して脂肪細胞分化を抑制する ○前田 豊信, 鈴木 厚子, 加藤 靖正 (奥羽大 歯 口腔機能分子)
P2-51	鳥賊骨粉末の骨芽細胞増殖効果の評価 ○Suwanna Korsuwannawong (Res Off, Fac Dent, Mahidol Univ)

P2-52	顆粒骨補填材の顆粒間隙と新生血管量について ○戸田 伊紀, 大西 吉之, 上村 守, 川島 渉, 竹村 明道 (大歯大 解剖)
P2-53	フィトケミカルの生体調節機能に関する研究—ベチュニジンの骨形成促進作用— ○前田 豊信 ¹ , 長岡 正博 ² , 鈴木 厚子 ¹ , 加藤 靖正 ¹ , 鈴木 恵子 ² (¹ 奥羽大 歯 口腔機能分子, ² 奥羽大 歯 歯科薬理)
P2-54	Klf4 遺伝子欠損マウスは頭部, 四肢の骨格発生異常を示す ○藤川 順司 ^{1,2} , Nomir Ahmed ¹ , 竹内 優斗 ¹ , 鬼頭 昭吉 ^{1,2} , 阿部 真土 ¹ , 脇坂 聡 ¹ (¹ 阪大 院歯 口腔解剖 1, ² 阪大 歯病 障害歯)
P2-55	間葉系幹細胞におけるクロモグラニン A の発現と役割 ○定岡 直 ¹ , 八上 公利 ² , 川原 一郎 ^{1,2} (¹ 松歯大 口腔衛生, ² 松歯大 院歯 健康増進口腔科学)
P2-56	骨組織における FGF23 産生細胞の経時的局在変化について ○櫻井 敦中 ^{1,2} , 長谷川智香 ² , 山本知真也 ² , 佐野 英彦 ¹ , 網塚 憲生 ² (¹ 北大 院歯 保存, ² 北大 院歯 硬組織発生)
P2-57	スフィンゴミエリン合成酵素 2 siRNA による骨芽細胞の機能発現に及ぼす影響 ○吉川 美弘, 堂前 英資, 鎌田 愛子, 池尾 隆 (大歯大 生化)
P2-58	骨芽細胞分化における転写因子 TFEB の関与 ○岡元 邦彰, 坂井 詠子, 西下 一久, 筑波 隆幸 (長大 院医歯薬 歯科薬理)
P2-59	補体成分 C1q が骨代謝に与える影響 ○青沼 史子 ¹ , 東 泉 ² , 大住 伴子 ² , 細川 隆司 ¹ , 竹内 弘 ² (¹ 九歯大 口腔再建リハ, ² 九歯大 口腔応用薬理)
P2-60	Ca ²⁺ 結合タンパク質 Sorcin の骨・軟骨組織での発現解析 ○河井まりこ, 大浦 清 (大歯大 薬理)
P2-61	レチノイン酸過剰・欠乏における septoclast の形態変化と増殖抑制のメカニズム ○坂東 康彦, 坂下 英, 崎山 浩司, 天野 修 (明海大 歯 解剖)
P2-62	抗 RANKL 抗体が若齢マウスの骨に及ぼす影響 ○唐川亜希子 ¹ , 井澤 基樹 ^{1,2} , 清原 秀一 ^{1,3} , 坂井 信裕 ¹ , 高見 正道 ¹ (¹ 昭大 歯 歯科薬理, ² 昭大 歯 小児成育歯, ³ 昭大 歯 インプラント)
P2-63	破骨細胞の欠如がメッケル軟骨の部位特異的消失様式に与える影響 ○井上貴一郎 (北大 院歯 口腔機能解剖)
P2-64	破骨細胞分化過程におけるニコランジルの抑制効果 ○岩城 太, 天野 均, 大浦 清 (大歯大 薬理)
P2-65	破骨細胞形成過程における細胞融合と細胞質分裂の形態学的解析 ○張 旗旗 ¹ , 白鳥 卓麻 ^{1,2} , 久木田明子 ³ , 山座 孝義 ¹ , 久木田敏夫 ¹ (¹ 九大 院歯 分子口腔解剖, ² 九大 院歯 インプラント, ³ 佐賀大 医 微生物)
P2-66	ファイブロネクチン N 末端断片は破骨細胞前駆細胞の CD13 に結合して破骨細胞形成を促進させる ○天野 滋, 大森 喜弘 (明海大 歯 口腔生物再生医工)
P2-67	Keap1 遺伝子欠損は Irf8 の発現上昇を介して破骨細胞分化を抑制する ○坂井 詠子, 福岡 裕, 西下 一久, 岡元 邦彰, 筑波 隆幸 (長大 院医歯薬 歯科薬理)
P2-68	オスミウム浸軟法による破骨細胞のゴルジ装置の立体微細構造および分布に関する走査型電子顕微鏡観察 ○山本 恒之, 坪井香奈子, 長谷川智香, 本郷 裕美, 網塚 憲生 (北大 院歯 硬組織発生)
P2-69	Pam ₃ CSK ₄ による RANK/RANKL 非依存性の破骨細胞形成とマウス頭蓋冠骨吸収作用について ○鈴木 恵子 ^{1,2} , 有本 隆文 ³ , 長岡 正博 ¹ , 桑田 啓貴 ³ , 篠田 壽 ⁴ (¹ 奥羽大 歯 歯科薬理, ² 昭大 歯 歯科薬理, ³ 昭大 歯 口腔微生物, ⁴ 東北大 院歯 環境歯学研セ)
P2-70	破骨細胞における CCN2 結合性アクチン骨格制御因子 CD302 の作用機序の解明 ○青山絵理子 ¹ , 久保田 聡 ^{1,2} , 滝川 正春 ¹ (¹ 岡大 院医歯薬 歯先端研セ, ² 岡大 院医歯薬 口腔生化)
P2-71	TAK-1 阻害による腫瘍進展の抑制と骨病変の改善効果 ○寺町 順平, 岡村 裕彦, 羽地 達次 (徳大 院医歯薬 口腔組織)
P2-72	酵素補充遺伝子治療を行った致死性低ホスファターゼ症モデルマウスの顎骨および歯に対する効果の解析 ○池上 良 ¹ , 高橋 有希 ² , 佐藤 亨 ¹ , 笠原 正貴 ² , 村松 敬 ³ (¹ 東歯大 クラウン補綴, ² 東歯大 薬理, ³ 東歯大 保存)

神経

P2-73	ビタミン C 欠乏の塩味及び酸味物質に対する鼓索神経応答への影響 ○安尾 敏明, 諏訪部 武, 山村 知暉, 碓 哲崇 (朝日大 歯 口腔生理)
--------------	---

P2-74	マウス味細胞における glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor (GIPR) の発現 ○高井 信吾 ¹ , ニノ宮裕三 ² , 重村 憲徳 ¹ (九大 院歯 口腔機能解析, ² 九大 味覚嗅覚センサ研究開発セ 感覚生理)
P2-75	酢酸誘発口内炎モデルラットにおける疼痛関連因子の変化 ○人見 涼露, 小野堅太郎, 野代 知孝, 伊藤 美紗, 稲永 清敏 (九歯大 生理)
P2-76	喉頭領域を支配する上喉頭神経における TRPV1 および TRPM8 チャネルの発現 ○安藤 宏 ¹ , 増田 裕次 ² , 北川 純一 ³ (松歯大 生物, ² 松歯大 院歯 顎口腔機能制御, ³ 松歯大 口腔生理)
P2-77	マウス鼓索神経・舌咽神経における SGLT1 を介する甘味情報 ○安松 啓子 ^{1,2} , 岩田 周介 ^{2,3} , 大栗 弾宏 ² , 重村 憲徳 ² , ニノ宮裕三 ^{1,3} (九大 味覚嗅覚センサ研究開発セ・感覚生理, ² 九大 院歯 口腔機能解析, ³ Monell Chemical Senses Center)
P2-78	食品の嗜好性の違いが咀嚼時の筋活動と咀嚼運動前後の自律神経・脳活動に与える影響 ○本間 志保 ^{1,2} , 脇坂 聡 ¹ (阪大 院歯 口腔解剖 1, ² 梅花女子大 看護保健 口腔保健)
P2-79	末梢神経損傷後の脊髄後角ニューロンの興奮性における時間空間的变化 ○寺山 隆司 ¹ , 山本 裕也 ^{1,2} , 岸本 宜子 ^{1,2} , 田畑 光康 ^{1,2} , 丸濱功太郎 ¹ , 飯田 征二 ² , 杉本 朋貞 ¹ (岡大 院医歯薬 口腔機能解剖, ² 岡大 院医歯薬 顎口腔再建外科)
P2-80	持続性の顎関節炎が両側性の咬筋に痛覚過敏を引き起こす中枢メカニズム ○岡本圭一郎 ¹ , 黒瀬 雅之 ¹ , 中谷 暢佑 ^{1,2} , 長谷川真奈 ³ , 藤井 規孝 ³ , 高木 律夫 ² , 山村 健介 ¹ (新潟大 院医歯 口腔生理, ² 新潟大 院医歯 顎顔面口外, ³ 新潟大 医歯病院 歯総診)
P2-81	ラット扁桃体連続電気刺激により誘発されるリズムミクな顎運動 ○佐藤 義英, 石塚 健一, 高橋 睦, 岩崎 信一 (日歯大新潟 生理)
P2-82	オレキシン A は GLP-1 の嚥下反射減弱作用を相殺する ○小橋 基, 藤田 雅子, 美藤 純弘, 松尾 龍二 (岡大 院医歯薬 口腔生理)
P2-83	発達期ラット三叉神経運動ニューロンへのグルタミン酸性シナプス入力 ○中村 史朗, 中山希世美, 望月 文子, 清本 聖文, 井上 富雄 (昭大 歯 口腔生理)
P2-84	無髄神経欠損モデルラットにおける島皮質局所回路の変化 ○村山 翔太 ^{1,2} , 小林 真之 ² (日大 歯 保存 II, ² 日大 歯 薬理)
P2-85	嗅覚認識にかかわる神経回路の探索—7T fMRI を用いた結合解析 ○深見 秀之, 佐原 資謹 (岩医大 歯 生理)
P2-86	孤束核および傍腕核の細胞の誕生時期と分布部位の関係 ○諏訪部 武, 安尾 敏明, 碓 哲崇 (朝日大 歯 口腔生理)
P2-87	麻酔下ラット延髄の後索核と三叉神経核における体性感覚ニューロンの発火パターン解析 ○穴戸新一郎 ^{1,2} , 戸田 孝史 ¹ (東北大 院歯 口腔生理, ² 赤門鍼灸柔整専門学校)
P2-88	離乳前ラットと捕食者臭を用いた環境ホルモン曝露の影響評価 ○藤本 哲也, 西川 泰央 (大歯大 生理)
P2-89	ノンレム睡眠時の咬筋活動に対するシタロプラムの作用 ○野川 泰泰 ¹ , 望月 文子 ² , 加藤 隆史 ³ , 片山 慶祐 ⁴ , 安部 友佳 ⁴ , 中村 史朗 ² , 中山希世美 ² , 馬場 一美 ⁴ , 若林 則幸 ¹ , 井上 富雄 ² (医科歯科大 院医歯 部分床義歯補綴, ² 昭大 歯 口腔生理, ³ 阪大 院歯 口腔解剖 2, ⁴ 昭大 歯 補綴)
P2-90	歯根膜機械刺激によって誘発される大脳皮質体性感覚野および島皮質の応答特性 ○金子 茉莉 ^{1,2} , 小林 真之 ² , 清水 典佳 ¹ , 堀貫 恵利 ^{1,2} (日大 歯 矯正, ² 日大 歯 薬理)

筋・・

P2-91	口唇随意運動時の脳活動の変化：fNIRS による分析 ○黒瀬 雅之 ¹ , 岡本圭一郎 ¹ , 長谷川真奈 ^{1,2} , 中谷 暢佑 ^{1,3} , 藤井 規孝 ² , 山田 好秋 ⁴ , 佐藤 義英 ⁵ , 山村 健介 ¹ , 増田 裕次 ⁶ (新潟大 院医歯 口腔生理, ² 新潟大 院医歯 顎顔面口外, ³ 新潟大 院医歯 顎顔面口外, ⁴ 東歯大, ⁵ 日歯大新潟 生理, ⁶ 松歯大 院 咀嚼機能)
P2-92	咬筋および心筋における咬合挙上の筋肥大効果とデキサメタゾンの拮抗作用 ○梅木 大輔 ¹ , 大貫 芳樹 ² , 伊藤 愛子 ¹ , 八木澤由佳 ¹ , 成山明具美 ³ , 石川美佐緒 ⁴ , 川村 直矢 ⁵ , 中村 芳樹 ¹ , 奥村 敏 ² (鶴大 歯 矯正, ² 鶴大 歯 生理, ³ 鶴大 歯 小児歯, ⁴ 鶴大 歯 口腔解剖, ⁵ 鶴大 歯 歯周病)
P2-93	癌周囲組織における筋の修復と High mobility group box 1 (HMGB1) の分布 ○小峰 雄介 ^{1,2} , 崎山 浩司 ¹ , 瀧澤 将太 ² , 坂東 康彦 ¹ , 天野 修 ¹ (明海大 歯 解剖, ² 明海大 歯 口腔顎顔面外科)
P2-94	C2C12 筋芽細胞において MyoD と CDK6 は miR-29a-Tet1 経路により制御される ○安藤 準 (鶴大 歯 物理)

P2-95	咬筋における小眼球症関連転写調節因子 <i>mitf</i> の生理機能の解明 ○成山明具美 ¹ , 大貫 芳樹 ² , 梅木 大輔 ³ , 伊藤 愛子 ³ , 川村 直矢 ⁴ , 八木澤由佳 ³ , 奥村 敏 ² , 朝田 芳信 ¹ (1鶴大 歯 小児歯, 2鶴大 歯 生理, 3鶴大 歯 矯正, 4鶴大 歯 歯周)
--------------	--

腫瘍・・

P2-96	TGF- β 1 は Slug/Wnt-5b/MMP-10 のシグナル伝達系によりヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-4 の浸潤能を誘導する ○加茂 政晴 ¹ , 樋野 雅文 ² , 客本 斉子 ¹ , 石崎 明 ¹ (1岩医大 歯 生化 細胞情報科学, 2岩医大 歯 口腔顔面再建外 口外)
P2-97	角化嚢胞性歯原性腫瘍の角化機構 ○落合 隆永 ¹ , 中野 敬介 ² , 長谷川博雅 ¹ (1松歯大 口腔病理, 2岡大 院医歯薬 口腔病理)
P2-98	口腔扁平上皮癌進展における分子シャペロン R2TP の作用機序の解析 ○柿原 嘉人 ¹ , 山崎 学 ² , 木口 哲郎 ¹ , 佐伯万騎男 ¹ (1新潟大 院医歯 歯科薬理, 2新潟大 院医歯 口腔病理)
P2-99	関節リウマチ滑膜線維芽細胞による VE-カドヘリン依存性疑似血管形成と細胞内シグナル伝達 ○山口 光祐, 須藤 遥, 今井 一志 (日歯大 生命歯 院歯 生化)

炎症・免疫・・

P2-100	Interleukin-33 (IL-33) による matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 発現増強メカニズムの解明 ○有吉 渉 ¹ , Chaweewannakorn Wichida ^{1,2} , 沖永 敏則 ¹ , 西原 達次 ¹ (1九歯大 感染分子生物, 2九歯大 口腔機能発達)
P2-101	肥満細胞におけるテトラヒドロピオプテリンによるセロトニン生合成の促進 ○大橋 晶子, 笠原 正彰, 内藤 昌子, 高橋 富久 (日大 歯 解剖 I)
P2-102	口腔病原体の誘引する腸内細菌叢バランス異常が非アルコール性脂肪肝疾患の病態進展に与える影響 ○大坂 利文 (東女医大 医 微生物免疫)
P2-103	低出力レーザー照射が血管内皮細胞の一酸化窒素と血管内皮細胞増殖因子発現に与える影響 ○茂呂祐利子, 原田 卓哉 (奥羽大 歯 放射線)
P2-104	ヒスタミンによる血管内皮細胞透過性の亢進を抑制するデクスメトミジン塩酸塩の作用機序 ○深田 哲也 ¹ , 戸円 智幸 ¹ , 橋本 修一 ² , 砂田 勝久 ³ (1日歯大 生命歯 共同利用研究セ アイソトープ研究施設, 2日歯大 生命歯, 3日歯大 生命歯 麻酔)
P2-105	MALDI-TOF-MS 法による食物アレルギーモデルマウスの腸内細菌叢の解析 ○片岡 嗣雄, 桑田 啓貴 (昭大 歯 口腔微生物)
P2-106	病原微生物による歯周病の免疫学的解析 ○永尾 潤一, 成田 由香, 田崎 園子, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田 (森岡) 健一, 長 環, 田中 芳彦 (福歯大 機能生物 感染生物)
P2-107	オメガ3 脂肪酸は歯周病細菌侵入マクロファージが誘導するインフラマソーム活性を抑制する ○沖永 敏則 ¹ , 有吉 渉 ¹ , 臼井 通彦 ² , 西原 達次 ¹ (1九歯大 感染分子生物, 2九歯大 歯周)
P2-108	マウス骨髄由来培養細胞において間葉系幹細胞は未分化単球/マクロファージを免疫抑制性マクロファージへと誘導する: 細胞接着の関与 ○客本 斉子 ¹ , 滝沢 尚希 ² , 大久保直登 ³ , 鈴木 啓太 ^{1,2} , 帖佐 直幸 ¹ , 衣斐 美歩 ⁴ , 加茂 政晴 ¹ , 八重柏 隆 ² , 石崎 明 ¹ (1岩医大 生化 細胞情報科学, 2岩医大 歯 歯周, 3北大 院薬 臨床病態, 4岩医大 薬 分子細胞薬理)
P2-109	マウス扁平上皮癌細胞のインターフェロン耐性は IFN 誘導性タンパク質 p204 (Ifi204) の非発現による ○山口 花, 大森 喜弘 (明海大 歯 微生物)
P2-110	口腔癌細胞におけるアポトーシス制御因子 GRIM-19 の発現制御機構 ○廣井 美紀 ¹ , 森 一将 ² , 嶋田 淳 ² , 大森 喜弘 ¹ (1明海大 歯 口腔生物再生医工 微生物, 2明海大 歯 病態診断治療 口腔顎顔面外科)
P2-111	低濃度 TLR7/8 アゴニスト全身投与の抗腫瘍効果と PD-L1 阻害との併用 ○西井 直人 ^{1,2} , 立浪 秀剛 ¹ , 近藤 雄太 ¹ , 原田 浩之 ² , 東 みゆき ¹ (1医科歯科大 院医歯 分子免疫, 2医科歯科大 院医歯 顎口腔外科)

微生物・・

P2-112	歯周病関連細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> の Mfa1 線毛構成タンパク質 Mfa4 のプロセッシングに関する研究 ○長谷川義明, 永野 恵司, 吉田 康夫, 吉村 文信 (愛院大 歯 微生物)
---------------	---

P2-113	<i>Porphyromonas gingivalis</i> における ATP 産生に関する phosphotransacetylase および acetate kinase の酵素学的解析 ○吉田 康夫 ¹ , 佐藤 満成 ^{1,2} , 毛塚雄一郎 ³ , 長谷川義明 ¹ , 永野 恵司 ¹ , 吉村 文信 ¹ (愛院大 歯 微生物, ² 愛院大 歯 有床義歯, ³ 岩医大 薬 構造薬学)
P2-114	<i>Porphyromonas gingivalis</i> のアミノ酸及びオリゴペプチド輸送系の解析 ○根本 優子, 小早川 健, 馬場 友巳, 根本 孝幸 (長大 院医歯薬 口腔分子生)
P2-115	<i>Porphyromonas gingivalis</i> 由来放射性同位元素標識 lipopolysaccharide の調製 ○戸田 智幸 ¹ , 橋本 修一 ² , 深田 哲也 ¹ , 藤田美也子 ³ , 倉治竜太郎 ³ , 伊藤 弘 ³ , 沼部 幸博 ³ (¹ 日歯大 生命歯 共同研 アイソトープ研究施設, ² 日歯大 生命歯, ³ 日歯大 生命歯 歯周病)
P2-116	揮発性硫化物産生における <i>Porphyromonas gingivalis</i> のトリブシン様酵素の役割 ○平嶺 浩子 ¹ , 渡辺 清子 ² , 熊田 秀文 ² , 浜田 信城 ² (¹ 神歯大 院歯 高度先進口腔医, ² 神歯大 院歯 口腔科学, ³ 神歯大 院歯 歯学教育)
P2-117	<i>Porphyromonas gingivalis</i> の酪酸産生に関する Succinyl-CoA 還元酵素の構造機能解析 ○毛塚雄一郎 ¹ , 吉田 康夫 ² (岩医大 薬 構造生物, ² 愛院大 歯 微生物)
P2-118	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ECF シグマ因子変異株における菌体表層性状の解析 ○菊池有一郎 ^{1,2} , 国分 栄仁 ^{1,2} , 柴山 和子 ¹ , 大原 直也 ³ , 中山 浩次 ⁴ , 石原 和幸 ^{1,2} (¹ 東歯大 微生物, ² 東歯大 口腔科研, ³ 岡大 院医歯薬 口腔微生物, ⁴ 長大 院医歯薬 口腔病原微生物)
P2-119	PI3K/Akt 経路に対する <i>P. gingivalis</i> ジンジバインの役割 ○中山 真彰 ^{1,2} , 内藤真理子 ³ , 中山 浩次 ³ , 大原 直也 ^{1,2} (¹ 岡大 院医歯薬 口腔微生物, ² 岡大 歯 先端研セ, ³ 長大院医歯薬 口腔病原微生物)
P2-120	マウスにおける <i>Porphyromonas gingivalis</i> の硫化水素産生酵素による生体反応の解析 ○塩屋 幸樹 ¹ , 平岡 行博 ² , 吉田 明弘 ¹ (松歯大 口腔細菌, ² 松歯大 総歯研)
P2-121	<i>P. gingivalis</i> 感染による p38/JNK を介したヒト胎盤栄養膜細胞のアポトーシス誘導 ○稲葉 裕明 ¹ , 天野 敦雄 ² , 仲野 道代 ¹ (岡大 院医歯薬 小児歯, ² 阪大 院歯 予防歯)
P2-122	<i>Prevotella intermedia</i> の産生する細胞外 nuclease の解析 ○深町はるか, 森崎 弘史, 有本 隆文, 片岡 嗣雄, 桑田 啓貴 (昭大 歯 口腔微生物)
P2-123	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> における small RNA の同定 ○大貝 悠一, 小松澤 均 (鹿大 院医歯 口腔微生物)
P2-124	<i>Streptococcus ferus</i> cariogenic factor 遺伝子の検索 ○桑原 紀子, 齋藤 真規, 續橋 治, 小林 良喜, 瀧澤 智美, 落合 智子 (日大松戸歯 微生物免疫)
P2-125	<i>Streptococcus sobrinus</i> の dextran-binding lectin AB 遺伝子変異の同定 ○田村 晴希, 山田ありさ (岩医大 薬理 病態制御)
P2-126	<i>Streptococcus oralis</i> 由来の過酸化水素はマクロファージのリソソームを傷害する ○岡橋 暢夫 ¹ , 中田 匡宣 ² , 桑田 啓貴 ³ , 川端 重忠 ² (阪大 院歯 フロンティア先端, ² 阪大 院歯 口腔細菌, ³ 昭大 歯 口腔微生物)
P2-127	環境温度の変化に対する肺炎球菌の適応と血中における菌体生存の関連 ○中田 匡宣, 住友 倫子, 山口 雅也, 川端 重忠 (阪大 院歯 口腔細菌)
P2-128	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 培養上清はインフルエンザウイルスの感染拡大に働く ○神尾 宜昌, 落合 邦康, 今井 健一 (日大 歯 細菌)
P2-129	口腔における <i>Actinomyces</i> 優勢菌の分離と同定方法の確立 ○内堀 聡史 ¹ , 續橋 治 ² , 小林 平 ¹ , 會田 雅啓 ¹ (日大松戸歯 クラウンブリッジ, ² 日大松戸歯 微生物免疫)
P2-130	<i>Actinomyces israelii</i> の分離用選択培地の開発とその口腔内分布 ○續橋 治 ¹ , 内堀 聡史 ² , 齋藤 真規 ¹ , 小林 良喜 ¹ , 瀧澤 智美 ¹ , 桑原 紀子 ¹ , 落合 智子 ¹ (日大松戸歯 微生物免疫, ² 日大松戸歯 クラウンブリッジ)
P2-131	ヒト歯肉溝から分離された赤色集落を呈する新菌種 <i>Propionibacterium gingivaerubrum</i> の解析 ○齋藤 真規, 桑原 紀子, 續橋 治, 瀧澤 智美, 小林 良喜, 落合 智子 (日大松戸歯 微生物免疫)
P2-132	口腔由来 <i>Rothia</i> 属細菌における硝酸還元性についての検討 ○真下 千穂, 円山 由郷, 山中 武志, 山根 一芳, 王 宝禮, 南部 隆之 (大歯大 細菌)
P2-133	糖代謝の生化学的性質からみる <i>Bifidobacterium</i> の齶蝕関連性 ○安彦 友希 ^{1,2} , 菅原 敦信 ³ , 村上 和弘 ³ , 川嶋 順子 ⁴ , 高橋 信博 ¹ (東北大 院歯 口腔生, ² 東北大 院歯 歯学イノベーションリエゾンセ, ³ 東北大 歯 6年, ⁴ 東北大 東北メディカルメガバンク機構)
P2-134	蛍光色素を用いた口腔プラークバイオフィルム代謝活性の高感度測定法 ○鷲尾 純平, 石黒 和子, 入江 大貴, 内山 愛理, 高橋 信博 (東北大 院歯 口腔生)
P2-135	歯の着色に影響を及ぼす歯周病原細菌について ○今井あかね ^{1,3} , 松田 貴絵 ² (¹ 日歯大新潟短大 歯科衛生, ² 日歯大新潟 小児歯, ³ 日歯大新潟 生)

P2-136	歯周病をひきおこす病原微生物の菌体成分の同定 ○成田 由香, 永尾 潤一, 田崎 園子, 有田 (森岡) 健一, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 長 環, 田中 芳彦 (福歯大 機能生物 感染生物)
P2-137	殺菌性を有する食品を利用した歯周病原細菌の制御に関する研究 ○中尾 龍馬, 泉福 英信 (感染研 細菌1)
P2-138	金属イオンによる消臭メカニズムの解明 ○谷口 奈央 ¹ , 中野 善夫 ² , 桑田 文幸 ² , 埴岡 隆 ¹ (福歯大 口腔保健, ² 日大 歯 化学)
P2-139	フランス海岸松樹皮抽出物の歯垢形成抑制効果 ○渡辺 清子 ¹ , 平嶺 浩子 ² , 遠山 歳三 ¹ , 佐々木 悠 ¹ , 浜田 信城 ¹ (神歯大 院歯 口腔科学, ² 神歯大 院歯 高度先進口腔医学)
P2-140	テルペン化合物のバイオフィルム浸透性における構造活性相関の検討 ○藤田 真理 ¹ , 長田 和実 ² , 宮川 博史 ¹ , 中澤 太 ¹ (北医療大 歯 微生物, ² 北医療大 歯 生理)
P2-141	アリルイソチオシアネートが <i>Candida albicans</i> に及ぼす影響 ○田村 宗明 ^{1,2} , 落合 邦康 ¹ , 今井 健一 ^{1,2} (日大 歯 細菌, ² 日大 総歯研 生体防御)
P2-142	若年層健康人における口腔内 <i>Candida</i> 属真菌の分離状況と薬剤感受性—第2報— ○福井佳代子 ¹ , 今井あかね ^{2,3} , 桑島 治博 ¹ , 仲村健二郎 ¹ (日歯大新潟 薬理, ² 日歯大新潟 生化, ³ 日歯大新潟 短大)
P2-143	<i>Candida albicans</i> 由来 CD4 ⁺ T 細胞分化誘導画分の解析 ○長 環, 田崎 園子, 永尾 潤一, 成田 由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田 (森岡) 健一, 田中 芳彦 (福歯大 機能生物化学)
P2-144	樹状細胞とマクロファージ細胞に対する <i>Candida albicans</i> の IL-1 β 産生誘導の違い ○長谷部 晃 ¹ , 佐伯 歩 ¹ , 亀崎 良助 ^{1,2} , 柴田健一郎 ¹ (北大 院歯 口腔病態 口腔分子微生物, ² 北大 院歯 口腔病態 口腔診断内科)

シグナル伝達

P2-145	TRAF6 によって制御される基礎的オートファジーは MyD88 の細胞内蓄積により誘導される炎症シグナルの自己活性化を抑制している ○引頭 毅, 堀江 俊, 猪俣 恵, 村上 幸孝 (朝日大 歯 口腔感染医療 口腔微生物)
P2-146	歯胚血管新生過程における調節因子の同定 ○春原 正隆, 関 伸一郎, 佐藤 巖 (日歯大 生命歯 解剖1)
P2-147	Smad4 と NF- κ B/p65 の会合領域の同定 ○浦田真梨子 ^{1,2} , 松原 琢磨 ¹ , 竹内 弘 ³ , 中富 千尋 ¹ , 平田-土屋 志津 ⁴ , 古株彰一郎 ¹ , 張 皿 ⁵ , 北村 知昭 ² , 自見英治郎 ¹ (九歯大 分子情報生化, ² 九歯大 保存, ³ 九歯大 口腔応用薬理, ⁴ 広大院医歯薬保 歯髄生物, ⁵ 九歯大 口腔病態病理)
P2-148	PRIP の卵胞機能における役割 ○松田 美穂, 平田 雅人 (九大 院歯 口腔細胞工学)
P2-149	SNARE 複合体形成と開口分泌調節における SNAP-25 リン酸化の役割 ○高 靖 ¹ , 平田 牧子 ¹ , 溝上 顕子 ¹ , 竹内 弘 ² , 平田 雅人 ¹ (九大 院歯 口腔細胞工学, ² 九歯大 口腔応用薬理)
P2-150	蛍光イメージングを用いた時計タンパク質の細胞内動態の解析 ○西出 真也 (北大 院医 細胞生理)

薬理作用

P2-151	リン酸水素イオンは bisphosphonate の骨芽細胞内取り込みを増加させる ○田島 雅道, 坂上 宏 (明海大 歯 薬理)
P2-152	ドキシソルピシンのヒト口腔ケラチノサイトに対する傷害性を緩和する物質の探索 ○坂上 宏 ¹ , 奥平 准之 ¹ , 天野 修 ² , 横瀬 敏志 ³ (明海大 歯 薬理, ² 明海大 歯 解剖, ³ 明海大 歯 歯内)
P2-153	ヒト歯髄幹細胞とヒト歯根膜細胞の分化能へのアスピリン作用の解析 ○筒井 健夫 ¹ , 小林 朋子 ¹ , 鳥居 大祐 ¹ , 松井美紀子 ¹ , 中原 貴 ¹ (日歯大 生命歯 薬理, ² 日歯大 生命歯 発生・再生)
P2-154	NSAIDs の骨芽細胞分化における COX 活性阻害非依存的効果の検討 ○松山 篤史 ^{1,2} , 東 泉 ² , 大住 伴子 ² , 諸富 孝彦 ¹ , 鷲尾 絢子 ¹ , 北村 知昭 ¹ , 竹内 弘 ² (九歯大 保存, ² 九歯大 口腔応用薬理)
P2-155	新規 KATP チャネル開口薬 ZD0947 の平滑筋型 KATP チャネルに対する効果 ○森 啓輔, 合島怜央奈, 檀上 敦, 山下 佳雄 (佐賀大 医 歯科口外)

P2-156	18 α -グリチルレチン酸は薬物性歯肉肥厚患者由来の線維芽細胞の増殖を抑制する ○竹内 麗理 ¹ , 松本 裕子 ² , 平塚 浩一 ¹ (1日大松戸歯 生化・分子生物, 2日大松戸歯 薬理)
P2-157	Mg, Ca 及び Zn は独立してヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ活性を促進する ○半谷 純一, 鈴木 邦明, 南川 元, 吉村 善隆 (北大 院歯 細胞分子薬理)
P2-158	分化脂肪細胞における D-dopachrome tautomerase 遺伝子の転写調節 ○岩田 武男 ¹ , 栗林 恭子 ² , 吉本 勝彦 ¹ (1徳大 院歯薬 分子薬理, 2獨協医大 口腔外科)

その他・・

P2-159	2つの酷似した歯科的情報が寄せられた白骨死体の個人識別についての事例 ○笠原 典夫, 中村 安孝, 永峰 史, 橋本 正次 (東歯大 法歯人類)
P2-160	微量試料からのトランスファー細胞を用いた DNA 型解析 ○丸山 澄 ^{1,2} , 堤 博文 ^{1,2} , 伊澤 光 ^{1,2} , 小室 歳信 ^{1,2} (1日大 歯 法医, 2日大 総歯研 社会歯)
P2-161	SureSelect システムを用いた ABO 式血液遺伝子型, ミトコンドリア DNA 型および HaloPlex 遺伝性不整脈関連心疾患リサーチパネルの同時解析 ○堤 博文 ^{1,2} , 丸山 澄 ^{1,2} , 伊澤 光 ^{1,2} , 小室 歳信 ^{1,2} (1日大 歯 法医, 2日大 総歯研 社会歯)
P2-162	トロミ剤の添加が咀嚼行動および食品食塊物性に及ぼす影響 ○塩澤 光一, 奥村 敏 (鶴大 歯 生理)
P2-163	魚類の耳石化石に観察される成長線に関する形態学及び分析学的研究 ○三島 弘幸 ¹ , 近藤 康生 ² , 見明 康雄 ³ (1高知学園短大 医療衛生 歯科衛生, 2高知大 自然科学 理, 3東歯大 組織発生)
P2-164	下顎臼歯および下顎骨の形成における塩分の役割 ○乾 千珠子 ¹ , 上田 甲寅 ² , 中塚美智子 ² , 松田 哲史 ² , 隈部 俊二 ² , 脇坂 聡 ¹ (1阪大 院歯 口腔解剖 1, 2大歯大 口腔解剖)
P2-165	ヒストンメチル化酵素 G9a は腱組織の正常な発生に必要である ○和田 悟史 ¹ , 出野 尚 ² , 島田 明美 ² , 上運天太一 ¹ , 中村 芳樹 ¹ , 中島 和久 ² , 木村 宏 ³ , 眞貝 洋一 ⁴ , 立花 誠 ⁵ , 二藤 彰 ² (1鶴大 歯 矯正, 2鶴大 歯 薬理, 3東工大 院 生命理工, 4理研 細胞記憶研究, 5徳大 疾患酵素学研究セ)
P2-166	様々な細胞に対するセラミクスナノ粒子の細胞刺激性の検討 ○成徳 英理 ¹ , 阿部 薫明 ² (1北大 院歯 保存, 2北大 院歯 生体材料)
P2-167	加齢に伴う生体リズムの減弱 ○高須 奈々 ^{1,2} , 草野慎之介 ^{1,3} , 中西祐一郎 ^{1,3} , 中村 渉 ¹ (1阪大 院歯 口腔時間生物, 2日本学術振興会 (RPD), 3阪大 歯)

抄 録

ロツテ基金特別講演 (PL-1)

ロツテ基金特別シンポジウム (FS-1～FS-3)

ライオン学術賞受賞講演 (L-1)

歯科基礎医学会学会奨励賞受賞講演 (Y-1～Y-4)

歯科基礎医学会学術シンポジウム (KS-1～KS-5)

日本学術会議シンポジウム (CS-1～CS-5)

メインシンポジウム (MSA-1～MSD-4)

ランチョンセミナー (LS-1～LS-3)

サテライトシンポジウム (SS1～SS16)

一般演題 (口演)

一般演題 (ポスター)

PL-1 iPS細胞と遺伝子改変霊長類技術を用いた未来の医療の開発

○岡野 栄之

慶應大 医 生理

ヒトの精神・神経疾患の研究が困難である理由として、①疾患モデルマウスが必ずしもヒトの病態を反映しない、②ゲノムでの遺伝子変異と表現型の因果関係を証明することが難しいことがある、③剖検脳の解析だけでは、疾患の onset において in vivo で何が起きているかを知ることが困難である、④疾患感受性細胞（脳の細胞）への accessibility が低い、④病態の中核を構成する神経回路が、同定されていない事が多いなどが挙げられる。我々は、これらの点を克服するために、iPS細胞技術と遺伝子改変霊長類を用いた解決を試みている。これ迄我々は、30以上の精神・神経疾患患者より iPS細胞を樹立し、病態を解析している。これらは、①小児神経疾患、②感覚器疾患、③精神疾患、④晩発性の神経変性疾患に分類出来る。本日は、ALS、アルツハイマー病、パーキンソン病などを中心に病態解析、創薬研究の成果について概説したい。これまで我々は、①薬剤誘導モデル、物理的手法による疾患モデルとして、脊髄損傷モデル (Iwanami et al., J Neurosci Res, 2005a)、脳梗塞モデル (Inoue et al. in preparation)、精神疾患モデル (Kishi et al. in preparation)；② lentivirus ベクターを用いたトランスジェニック技術を用いた疾患モデルとしてパーキンソン病モデル、アルツハイマー病モデル、ALS モデルを開発し、③ゲノムエディティング技術を用いた疾患モデルとして Rett 症候群モデル (Kishi et al., unpublished) を作成中である。本講演では、これらの疾患モデルを用いた前臨床研究 (Iwanami et al., J Neurosci Res, 2005b, Kitamura et al., PLoS ONE, 2011; Kobayashi et al., 2012) と治療法の開発について紹介したい。

【利益相反】 著者は利益相反状態にあります。(SanBio 社の founding scientist 及び Scientific Advisory Board を務めます)

Modeling human psychiatric/neurological disorders using iPS cell technologies and transgenic non-human primates

○Hideyuki Okano

Dept Physiol, Keio Univ Sch Med

What makes the investigation of human psychiatric/neurological disorders so difficult? This could be attributed to the following reasons 1) Diseases model mice do not always recapitulate the pathophysiology of human diseases, 2) It is extremely difficult to investigate what is taking place in vivo at the onset of the disease due to the low accessibility to the pathological foci in the brain, and 3) The responsible neuronal circuits for the phenotype are not identified.

In order to overcome these difficulties, we took advantage of iPS cell technologies and transgenic non-human primates for modeling human psychiatric/psychiatric disorders. So far, we have established iPS cells from the patients of about 40 human psychiatric/psychiatric disorders and characterized their pathophysiology (Okano and Yamanaka, Mol Brain, 2014). In the present talk, we also wish to mention our recent data of generation of common marmoset transgenic models of neurodegenerative diseases, including Parkinson disease, Alzheimer disease and ALS. Furthermore, we could generate knock-out technologies of common marmoset using genome editing technologies for the generation of transgenic marmoset model of autism and psychiatric disorders.

Conflict of Interest: H.O. is a founding scientist and a Scientific Advisory Board of SanBio Co. Ltd.

FS-1 The maturation of gene therapy: oral and general applications now and on the horizon

○Bruce J. Baum

Scientist Emeritus, Natl Inst Dent Craniofac Res

Gene therapy, the transfer of a gene or other oligonucleotide for therapeutic use, was originally conceived > 50 years ago as a way to correct inherited genetic disorders and treat cancers refractory to conventional therapy. As such, it is an early example of regenerative medicine that proceeded from a novel and highly speculative idea to an actual clinical application. From such an historical perspective, this presentation will review key principles of how clinical gene therapy is accomplished, some key problems that have driven the field scientifically and ethically, and the expansion of its use well beyond the goals initially imagined. Importantly, in the last ~15 years gene therapy has seen several notable and successful applications that will be described, including those for severe combined immunodeficiency XI, Leber's Congenital Amaurosis (an inherited form of blindness) and the recent, first regulatory approval for any gene therapy, i.e., the treatment of familial lipoprotein lipase deficiency (Glybera) in Europe. In the oral cavity, many studies have demonstrated a spectrum of possible applications for gene therapy in addition to its early use in potentially treating squamous cell carcinoma. Of these, the area that has seen the most advance is with salivary glands. The first bench to clinical oral gene therapy, transferring the cDNA for human aquaporin-1 to parotid glands for the repair of radiation-induced salivary hypofunction, i.e., a quality of life disorder, will be discussed in detail. Lastly, several developing applications that should have considerable impact on both general and oral gene therapy in the near future will be highlighted, specifically including the use of small oligonucleotides, gene editing technologies, and non-viral methods for gene delivery. Gene therapy, while not new conceptually, is still very much a field in relative adolescence, but one with enormous research and clinical potential.

Conflict of Interest: None

FS-2 臓器線維症に対する VA-liposome HSP47 を用いた治療法の開発

○新津洋司郎

北大 フード & メディカルイノベーションセ 分子標的探索研究

臓器（組織）が慢性に傷害を受けると、その結果として線維沈着が生ずるのは必発である。これはいわば生体の防御反応であるが、一方で、沈着した線維が臓器の正常な機能を妨げ、進行すると機能不全を惹起する。従って沈着した線維を融解する治療法の開発は長い間待たれて来たが、未だ臨床の場で用いる事が出来るものは皆無である。

我々は線維症を引き起こす（コラーゲンを産生する）細胞は各臓器で極めて類似しており、いずれも Vitamin A を取り込む性質がある事に着目し、その細胞からのコラーゲン分泌を抑制する目的で、コラーゲン分泌に必須の役割を演ずる HSP47 蛋白に対する siRNA を Vitamin A を表出するリポソームに含有させ、静注する事で同細胞からのコラーゲン分泌を抑制するという戦略を提案し、実際に、肝硬変、肺線維症、慢性膵炎、骨髄線維症などの動物モデルでその有効性を調べた。

結果として、全ての臓器線維症に対して有意な線維融解を示すことが出来た。また、同時に予期せぬ随伴現象として、臓器の再生も惹起された。これらの知見を基に、現在臨床治療を行っている。

本シンポジウムでは、まずどのような発想（concept）でこの strategy を構築したかを述べ、次いでその concept を証明する（proof of concept）為の in vitro の実験、その結果を基に動物実験へと展開した経緯を詳述する。ただし、臨床成果については様々な制約がある為割愛させて頂く。

【利益相反】 著者は利益相反状態にあります。

Development of therapeutic modality for fibrosis by use of VA- liposome HSP47

○Niitsu Y

Molecular Target Exploration Lab, Center for FMI, Hokkaido Univ

Chronic organ (tissue) injury results in fibrosis, which is natural biological defense against the organ injury while fibrosis itself interferes with abilities of organ functions and subsequently causes organ failure. Thus despite therapy for fibrosis is long-awaited, there is no clinically useful approach.

On the basis of features that the cells which can provoke fibrosis by producing collagen are propinquity in each organ and have a common function, uptake of Vitamin A, we have attempted to suppress collagen secretion from the cells in vivo by using siRNA against HSP47 protein, a collagen chaperone, encapsulated in Vitamin A-coupled liposome. So far, we have examined effectiveness of this approach on liver cirrhosis, lung fibrosis, chronic pancreatitis and bone-marrow fibrosis in animal models. As a result, significant therapeutic effects on all the types of fibroses were observed. Moreover, regeneration of organs was also induced by this treatment, unexpectedly. On the basis of these results, clinical study of this anti-fibrosis therapy is currently ongoing worldwide.

In this symposium, I will first explain how we established a concept of our strategy, then present in vitro data, proving the concept, and finally demonstrate successful resolution of fibrosis in animal models. However, I have to exclude the results of clinical study due to restrictions on disclosing information.

Conflict of Interest: The authors declare conflict of interest associated with this manuscript.

FS-3 ゲノム編集による遺伝子改変の最前線

○佐久間哲史

広大院理 数理分子生命理学

次世代の遺伝子改変技術であるゲノム編集は、近年急速な発展を遂げ、基礎生物学分野はもちろん、農水畜産学、微生物工学、環境工学、そして医歯薬学と、あらゆる生命科学関連研究において必須の研究手法となりつつある。ゲノム編集では、任意のゲノム領域にDNA二本鎖切断を導入し、内在の修復機構を利用することで、遺伝子のノックアウトやノックイン、染色体操作（広域欠失や逆位、転座など）が可能となる。これにより、例えば遺伝性疾患患者に由来するiPS細胞の点突然変異をゲノム編集で修復し、自家移植を行う*ex vivo*の遺伝子治療や、患者の体内で標的細胞のみを直接改変する*in vivo*の遺伝子治療も現実味を帯びてきている。更に、DNA配列そのものには傷を入れず、DNAやヒストンの化学修飾のみを改変することで、遺伝子座特異的に発現を調節するエピゲノム編集技術の開発も盛んに進められており、エピゲノム異常が原因となるがんの抑制に応用することも可能となるかもしれない。本講演では、ゲノム編集の原理と応用について、演者による研究開発の経緯を交えながら、基礎情報から最新の研究動向に至るまでを俯瞰的に概説する。更に、基礎歯科学や臨床歯科学における応用の可能性について紹介すると共に、医療応用上での倫理的問題についても議論したい。ゲノム編集の技術開発は、生命科学研究史上、類を見ないほど日進月歩で進んでおり、またその重要性は日増しに高まっている。一方で、あまりの進展速度の速さゆえ、現状を把握しきれない研究者が多いのもまた事実である。本講演がゲノム編集の最新動向を理解する一助となれば幸いである。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Front-line of genetic engineering using genome editing technology

○Sakuma T

Dept Math and Life Sci, Grad Sch Sci, Hiroshima Univ

Recently emerged genome editing technology has been rapidly developed and become an essential research tool for not only basic biology but also agricultural, fishery and zootechnical sciences, bacterial and ecological engineering, and medical, dental and pharmacological sciences. Genome editing enables gene knockout and knock-in or chromosome editing including large deletions, inversions, and translocations by introducing DNA double-strand break at the desired genomic region. This technology would be utilized for *ex vivo* or *in vivo* gene surgery for the patents of genetic diseases. Furthermore, gene-specific transcriptional control via site-specific modification of the epigenetic marks on DNA or histones (i.e. epigenome editing) has also been developed. It may be utilized for the suppression of cancer caused by such epigenetic changes. In this presentation, I will talk about the basics and applications of genome editing technology.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

L-1 遺伝子データベースを応用した器官形成機構の解明

○阪井 丘芳

阪大 院歯 顎治

唾液腺、肺、腎臓、前立腺などの器官は、胎生期に上皮組織が枝分かれ（分枝）を繰り返すことにより形成される。分枝形態形成は三次元的な立体構造を有する器官形成にとって重要な現象であり、再生研究にとっても有用な情報が含まれている。その過程において上皮と間葉の相互作用、基底膜の役割、細胞外マトリックスや増殖因子の関連について優れた研究が展開されているが、詳細な分子機構は明らかにされていない。

演者は、唾液腺をモデルとして、分枝形態形成の初期に生じる上皮組織の cleft（裂け目）形成に着目した。凍結切片から唾液腺上皮の cleft と bud（先端）の部位の組織をレーザーマイクロダイセクション法にて取り出し、自らが開発した T7-SAGE 法でそれぞれに発現する遺伝子群を網羅的に同定した (Gene Expression Omnibus, GSE22374)。さらに、cleft の遺伝子データベースから細胞外マトリックス Fibronectin (FN) と転写因子 Btd7 を同定した。FN は、唾液腺および肺の発生時期に強く発現し、上皮の分枝形態形成を制御していた。Btd7 は、転写因子 Snail の発現を高め、上皮接着因子 E-cadherin の発現を抑制することにより、上皮細胞の細胞-細胞間接着を阻害し、細胞-細胞外マトリックス接着へと変換することにより、上皮細胞の遊走性を高め、分枝形成を誘導していた。Btd7 が FN によって発現を誘導され、FN-Btd7-E-cadherin の関与が器官形成の初期過程において重要であることも明らかになった。昨年、胎生期に唾液腺自身がメラトニンを発現し、bud に存在する受容体を介して唾液腺の大きさを制御することも示された。

現在では、既存薬の中から器官形成・再生を誘導する薬剤、器官の障害を予防する薬剤を探索し、その分子機構を解析しており、基礎から臨床を目指した研究を展開している。本講演では、若手研究者にも参加しやすいように、臨床家として研究にあこがれた動機、人との出会い、苦労と挫折、周囲に支えて頂きながら継続している研究の楽しみについても触れたいと考えている。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Exploration of functional regulators for branching morphogenesis of salivary gland epithelia by microanalysis of gene expression

○Sakai T

Dept Oral-facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

Many organs such as salivary glands, kidneys and lungs form multiple epithelial clefts during the process of embryonic branching morphogenesis. In cleft formation, buds are delineated by the conversion of epithelial cell-cell adhesions to cell-matrix adhesions, but the mechanisms of cleft formation are not clear. A combination of laser microdissection with T7-SAGE has been established as a method for gene discovery of candidate molecules that may be essential for early organ morphogenesis. We have identified Fibronectin and Btd7 at cleft-forming sites and provided insights into the mechanisms of dynamic cleft propagation. Wedges of fibronectin translocate inward as clefts form between randomly motile epithelial cells, accompanied by loss of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in cells adjacent to the fibronectin. How a matrix molecule can drive cleft formation and branching is unknown. Btd7 provides a mechanistic link between the extracellular matrix and cleft propagation through its highly focal expression leading to local regulation of Slug, E-cadherin, and epithelial cell motility. Btd7 is a dynamic regulatory gene that promotes epithelial tissue remodeling and formation of branched organs. Progress in understanding the mechanisms of salivary branching morphogenesis should provide novel approaches to future tissue engineering or regeneration of damaged salivary glands.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

Y-1 骨代謝における時計遺伝子の関与

○平居 貴生

愛院大 歯 薬理

骨代謝には概日リズムが認められる。近年、遺伝子破壊個体の作出のアプローチなどによって、時計遺伝子 *Period1*, *Period2*, および *Bmal1* の骨代謝への関与に関する知見が集積されつつあるが、骨代謝における概日時計とその分子機構については不明な点が多く残されている。一方、こうした状況下、骨芽細胞における時計遺伝子 *Period1*, *Period2*, *Period3*, および *Bmal1* は交感神経系シグナルによって同調化されることを既に報告した。また、骨芽細胞に発現する時計遺伝子が骨代謝制御機構に関与する可能性について検討するために、培養した骨芽細胞株 MC3T3-E1 に対して非選択的 β アドレナリン受容体 (AR) アゴニストであるイソプレナリン (Iso) で処理した後、マイクロアレイ解析とリアルタイム PCR 法を用いて、Iso 処置によって変動がみられる遺伝子の探索を行った。その結果、骨芽細胞では β AR シグナルによって発現上昇する時計遺伝子 nuclear factor interleukin 3 (Nfil3)/e4 promoter binding protein 4 (E4BP4) Nfil3 が骨代謝関連分子シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2/prostaglandin endoperoxide synthase 2) の遺伝子発現を制御することが明らかとなった。現在は、この転写因子 Nfil3/E4BP4 に着目し、骨芽細胞における Nfil3/E4BP4 の機能解析を行っている。本シンポジウムでは骨代謝における Nfil3/E4BP4 の役割に関する知見を中心に報告したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Involvement of circadian clock in bone metabolism

○Hirai T

Dept Pharmacol, Sch Dent, Aichi-Gakuin Univ

Recent studies indicated that SCN-controlled circadian hormonal rhythms and sympathetic tone played a central role in biological oscillations in bone. We have demonstrated that adrenergic receptor (AR) signaling plays an important role in the regulation of clock works in osteoblasts. On the other hand, we recently reported that AR signaling regulated clock genes and the expression of *prostaglandin endoperoxide synthase 2* (Ptgs2) by up-regulating the basic leucine zipper transcriptional factor nuclear factor IL-3 (Nfil3)/e4 promoter binding protein 4 (E4BP4) in osteoblasts. The transcription factor Nfil3/E4BP4 is involved in the mammalian circadian clock and plays an important role in regulating the basic functions of a wide range of cell types. In the present study, we determined whether Nfil3/E4BP4 contributed to regulating the cellular function of osteoblasts. These studies may contribute to a deeper understanding of the mechanisms underlying the molecular clock in bone remodeling.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

Y-2 進行性骨化性線維異形成症から同定された ALK2 変異体は II 型受容体に対する感受性が異なる

○藤本 舞^{1,2}, 大手 聡¹, 大澤 賢次¹, 宮本 阿礼¹, 塚本 翔¹, 水田 誉人¹, 古株彰一郎¹, 須田 直人², 片桐 岳信¹

¹埼玉医大 ゲノム医学研究セ 病態生理, ²明海大 歯 形態機能成育 歯科矯正

FOP (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; FOP) は、成長に伴い骨格筋組織内に異所性骨化を生じる遺伝性疾患である。幼少期から発症する典型的 FOP 症例から、BMP の I 型受容体の 1 つである ALK2 の機能獲得型変異が同定されたが、その活性化機構には不明な点が残されていた。そこで本研究では、典型的 FOP 症例と遅発性 FOP 症例から同定された新規の ALK2 変異体を比較解析し、FOP における変異 ALK2 の活性化機構の解明を目指した。典型的 FOP および遅発性 FOP のいずれの ALK2 変異体も、筋芽細胞 C2C12 細胞に BMP の II 型受容体である BMPR-II または ActR-IIb と共発現させると、ALK2 変異体単独の場合よりもさらに BMP 活性が上昇した。この II 型受容体による ALK2 変異体の活性化には、II 型受容体のキナーゼ活性が必要であった。そこで、ALK2 のリン酸化部位を解析すると、活性化には細胞内ドメインの 203 番スレオニン残基 (T203) が必須なことが判明した。FOP の ALK2 変異体は、野生型 ALK2 よりも高度にリン酸化され、II 型受容体の共発現でリン酸化レベルがさらに上昇した。しかし、FOP の ALK2 変異体の T203 を Val 残基に置換すると、ALK2 全体のリン酸化レベルが低下した。ALK2 の 203 番に相当する Thr 残基は全ての I 型 BMP 受容体に共通であり、BMP シグナルの活性化に必須であった。以上の結果から、FOP の ALK2 変異体は II 型受容体によってリン酸化を受けやすいことが、BMP シグナル活性化の原因であると予想された。II 型受容体による ALK2 変異体の活性化には、ALK2 の T203 残基が重要であった。ALK2 の T203 は、ALK2 分子全体のリン酸化レベルを制御する重要なアミノ酸残基である可能性が示された。本研究の成果は、FOP の ALK2 変異体が II 型受容体依存的に活性化されるステップが、新しい FOP 治療法開発の標的となる可能性を示す。**【利益相反】** 利益相反状態にないことを宣言する。

Mutant activin-like kinase 2 in fibrodysplasia ossificans progressiva are activated via T203 by BMP type II receptors

○Fujimoto M^{1,2}, Ohte S¹, Osawa K¹, Miyamoto A¹, Tsukamoto S¹, Mizuta T¹, Kokabu S¹, Suda N², Katagiri T¹

¹Div Pathophysiol, Res Center for Genomic Med, Saitama Med Univ, ²Div Orthodont, Dept Human Dev Fostering, Meikai Univ Sch Dent

Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a genetic disorder characterized by progressive heterotopic ossification in soft tissues, such as the skeletal muscles, after birth. FOP has been shown to be caused by gain-of-function mutations in activin receptor-like kinase (ALK)-2, which is one of type I receptors for bone morphogenetic proteins (BMPs). In the present study, we examined the molecular mechanisms that underlie the activation of intracellular signaling by mutant ALK2 found in patients with typical FOP and late-onset FOP. Both types of mutant ALK2 were enhanced to activate intracellular signaling by the co-expression of type II BMP receptors, such as BMPR-II and activin receptor, type II B. This enhancement was dependent on the kinase activity of the type II receptors. Among the nine serine and threonine residues in the phosphorylation domain of ALK2 by type II receptors, T203 was found to be critical for the enhancement by type II receptors. The Thr residue at 203 in ALK2 was conserved in all of the BMP type I receptors, and these Thr residues were essential for the intracellular signal transduction in response to ligand stimulation. The phosphorylation levels of the mutant ALK2 were higher than those of wild-type ALK2 and were further increased by the presence of type II receptors. However, the phosphorylation levels of ALK2 were greatly reduced in mutants carrying a mutation at T203 even in the presence of type II receptors. These findings suggest that the mutant ALK2 found in FOP is enhanced by BMP type II receptors via the T203-regulated phosphorylation of ALK2.

Conflict of Interest: The other authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

Y-3 甘味受容体 TAS1R2/TAS1R3 におけるギムネマ酸の甘味抑制効果の分子メカニズム

○實松 敬介¹, 重村 憲徳¹, ニノ宮裕三²

¹九大 院歯 口腔常態制御 口腔機能解析, ²九大 味覚・嗅覚センサ研究開発セ 感覚生理

甘味受容体 TAS1R2/TAS1R3 のリガンド特性には顕著な種差がある。ギムネマ酸は、植物ギムネマ・シルベスタ由来のトリテルペン配糖体で、ヒトの甘味を選択的に抑制するがマウスには無効である。この事実は、甘味受容体 TAS1R2/TAS1R3 の、系統発生や進化の過程における食環境に適応した種特異的なアミノ酸変異に基づくものと推定されるが、その抑制分子メカニズムについては長年不明であった。本研究では、甘味受容体 TAS1R2/TAS1R3 のヒト型・マウス型およびそのキメラ体を HEK 細胞に再構築し、それら各種 TAS1R2/TAS1R3 とギムネマ酸の相互作用を調べた。その結果、ギムネマ酸はヒト TAS1R2/TAS1R3 の甘味応答を抑制したが、マウス型には働かず、受容体結合特性の種差が確認された。次に、ヒト・マウス・キメラ体のギムネマ酸の効果を検索したところ、ギムネマ酸感受性にはヒト TAS1R3 の膜貫通ドメインが不可欠であることが示唆された。また、分子モデリングによりその部位にギムネマ酸が結合することが推定された。ヒト TAS1R3 膜貫通領域のアミノ酸の点変異の解析により、第 3, 第 5, 第 6 ヘルックスで囲まれたドメインにギムネマ酸が結合している可能性が強く示唆された。さらに、ギムネマ酸の構造内のどの部位が甘味抑制に関与しているかを調べたところ、ギムネマ酸の持つグルクロノシル基が甘味抑制に重要であることが明らかにされた。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Molecular mechanisms of sweet-suppressing effect by gymnemic acids on the sweet taste receptor, TAS1R2/TAS1R3

○Sanematsu K¹, Shigemura N¹, Ninomiya Y²

¹Sect Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ, ²Div Sensory Physiol, Res Dev Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu Univ

Gymnemic acids (GAs) are triterpene glycosides that selectively suppress taste responses to various sweet substances without affecting salty sour and bitter compounds. The sweet-suppressing effect of GAs are specific to humans but not to mice. Here we focus on the molecular mechanisms for the sweet-suppressing effect of GAs. To investigate whether GAs directly interact with human (h) sweet receptor hTAS1R2/hTAS1R3, we utilized a sweet receptor assay based on changes in intracellular calcium in HEK293 cells expressing TAS1R2/TAS1R3.

Similar to previous studies, gymnemic acids inhibited the $[Ca^{2+}]_i$ responses to sweet compounds in HEK293 cells expressing hTAS1R2/hTAS1R3 but not in those expressing the mouse (m) sweet receptor mTas1R2/mTas1R3. Using species-specific sensitivities to GAs, we found that the interaction site for GAs was the transmembrane domain of hTAS1R3. Glucuronic acid, the common structure of gymnemic acids, also reduced sensitivity to sweet compounds, suggesting that the glucuronosyl group of GAs is required for sweet-suppressing effect. In our models, gymnemic acids were predicted to dock to a binding pocket within the transmembrane domain of hTAS1R3.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

Y-4 ポルフィロモナス・ジンジバリスが産生するジンジパインによる PI3 キナーゼ/Akt 経路抑制の分子機序

○中山 真彰^{1,2}

¹岡大 院医歯薬 口腔微生物, ²岡大 歯先端領域研究セ

Porphyromonas gingivalis は、歯周組織に影響を及ぼし、口腔機能の低下を招く。本研究では、細胞の生存・増殖、代謝などに重要な機能を持つ PI3K/Akt 経路に対する *P. gingivalis* 感染の影響とその作用機序を解析した。歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* を感染させ、PI3K と Akt の kinase 活性、Akt 下流タンパク質 (GSK3, mTOR, Bad) のリン酸化レベルを検討した。*P. gingivalis* 感染によって、PI3K と Akt の活性は抑制され、GSK3, mTOR, Bad のリン酸化レベルの減少が認められた。この現象は、*P. gingivalis* の細胞内への侵入によるものではないことは確認した。また *P. gingivalis* の病原因子ジンジパインの関与を調べるために、ジンジパイン完全欠損変異株 (*PgMT*) を用いた感染実験を行ない、野生株 (*PgWT*) を用いた場合と比較したところ、ジンジパインの酵素活性が PI3K や Akt の抑制に必要であることが示された。そして *P. gingivalis* 感染における PI3K 調節サブユニット p85 α と膜タンパク質の複合体形成への影響を調べた結果、*PgWT* 感染によって、その複合体形成の阻害が示唆された。次に、Akt 上流タンパク質 PDK1 の局在を調べたところ、細胞膜に局在する PDK1 の割合が、非感染の対照および *PgMT* 感染と比べて *PgWT* 感染で減少した。従って、*P. gingivalis* 感染においてジンジパインが細胞膜タンパク質に作用することで PI3K の活性低下を引き起こし、PDK1 の細胞膜局在を変化させ、PDK1/Akt の伝達を遮断することが、Akt の活性抑制および Akt の下流タンパク質への影響に繋がっていると考えられた。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Attenuation of the PI3 kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp

○Nakayama M^{1,2}

¹Dept Oral Microbiol, Grad Sch Med, Dent and Pharma Sci, Okayama Univ, ²Adv Res Center for Oral and Craniofac Sci, Dent Sch, Okayama Univ

Porphyromonas gingivalis is a major pathogen of periodontal diseases. We investigated that *P. gingivalis* affect PI3K/Akt (protein kinase B) signaling pathway in gingival epithelial cells. Here, we showed the novel mechanism by which *P. gingivalis* inactivated PI3K and Akt, and dephosphorylated GSK3 α/β , mTOR, and Bad, which are downstream proteins in the PI3K/Akt cascade. However, these events did not require *P. gingivalis* invasion into the cells. To reveal the virulence factor of *P. gingivalis* for the events, we focused three cysteine proteases “gingipains”, which are RgpA, RgpB, and Kgp from *P. gingivalis*, and used gingipain-specific inhibitors and a gingipain-deficient mutant (*PgMT*). We found that the gingipains and their protease activities were essential for the inactivation of PI3K and Akt. The associations between the PI3K regulatory subunit p85 α and membrane proteins were disrupted by gingipains under wild-type *P. gingivalis* (*PgWT*) infection. Moreover, *PgWT*, but not *PgMT*, reduced PDK1 translocation to the plasma membrane. Therefore, it is likely that PI3K failed to transmit homeostatic extracellular stimuli to intracellular signaling pathways by gingipains. Taken together, our findings indicate that *P. gingivalis* gingipains attenuate the PI3K/Akt signaling pathway, resulting in the disturbance of PI3K/Akt-dependent cellular functions and the destruction of epithelial barriers.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

KS-1 エピプロフィン は 歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞系への誘導と分化を制御する多機能制御因子である

○山田 吉彦¹, 酒井 陽^{1,2}, 千葉 雄太^{1,5}, Darius Mahboubi¹, 池内 友子¹, 石河 真幸^{1,3},
中村 卓史⁴, 福本 敏⁵

¹Lab of Cell and Dev Biol, NIDCR, NIH

²名大 院医 頭頸部感覚器外科 顎顔面外科

³東北大 院歯 口腔修復 歯科保存

⁴東北大 院歯 口腔生物 歯科薬理 薬

⁵東北大 院歯 口腔保健発育 小児発達歯

歯の発生において、歯原性上皮幹細胞は内エナメル上皮 (inner dental epithelium: IDE) 細胞や、中間層細胞を含むエナメル質形成に重要な複数の細胞系に分化する。これらの細胞系のなかで IDE 細胞は細胞増殖期を経てエナメル芽細胞前駆細胞となり、その後エナメル芽細胞へと分化していく。

我々は、歯胚より新規 Sp zinc-finger 転写因子、エピプロフィン (epiprofin: Epf_n/Sp6) を同定し、Epf_n が歯をはじめとした外胚葉器官の発生過程で発現していることを見いだした。歯の発生過程において、Epf_n は蕾状期から歯胚に発現し、分化が進むにつれ発現レベルを増強しながら IDE 細胞に発現が限局されていく。また Epf_n^{-/-} マウスは重度のエナメル質形成不全と過剰歯を呈する。このエナメル質形成不全のメカニズムを解析したところ、IDE 細胞の細胞増殖が減少し、本来 IDE 細胞が存在すべき領域に Sox2 陽性の歯原性上皮幹細胞が延長して存在することで IDE への誘導が阻害されていることがわかった。そこで我々は Epf_n が歯原性幹細胞の内エナメル上皮細胞への運命決定に関わっていると仮説を立て、マウス歯原性上皮幹細胞株である CLDE 細胞、及びノックアウトマウスモデルを用いて Epf_n の機能を解析した。その結果、Epf_n は Sox2 発現を誘導することで幹細胞である状態を維持している転写因子 T-box1 (Tbx1) を制御することを明らかにした。Epf_n は Tbx1 との相互作用により Tbx1 自身の Sox2 誘導の転写活性を抑制することで Sox2 の発現を抑制していた。また、CLDE 細胞において Epf_n の低レベル発現誘導を行うと細胞の増殖が促進され (IDE 細胞への運命決定)、高レベル発現誘導を行うとエナメル芽細胞への分化が促進された。

以上の結果より、Epf_n はエナメル芽細胞の発生過程において、歯原性幹細胞の IDE 細胞の誘導、IDE 細胞の増殖、エナメル芽細胞の分化を含むすべてのエナメル芽細胞発展のプロセスに関与しており、Epf_n の発現レベルの違いがエナメル芽細胞の分化ステージに応じた Epf_n の異なる機能を制御していることが明らかとなった。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Epiprofin regulates dental epithelial stem cell fate to the ameloblast lineage and differentiation through its multiple functions

○Yamada Y¹, Sakai K^{1,2}, Chiba Y^{1,5}, Mahboubi D¹, Ikeuchi T¹, Ishikawa M^{1,3}, Nakamura T^{1,4},
Fukumoto S^{1,5}

¹Lab Cell Dev Biol, NIDCR, NIH

²Dept Oral Maxillofac Surg, Nagoya Univ Grad Sch Med

³Dept Restorative Dent, Div Oper Dent, Tohoku Univ, Grad Sch Dent

⁴Div Mol Pharmacol Cell Biophysics, Dept Oral Biol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

⁵Div Pediatr Dent, Dept Oral Health Dev Sc, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Dental epithelial stem cells differentiate into all dental epithelial cell types to form enamel. One of these cell

types is the ameloblast progenitor cell, which forms the dental epithelium (IDE). After the progenitor cells proliferates, they eventually stops proliferation, and differentiates unto enamel matrix-secreting ameloblasts. We previously identified epiprofin (Epf_n/Sp6) as a member of the Sp zinc-finger transcription factor family from tooth germs. Epf_n is expressed in the dental epithelium at the initiation stage. Later, its expression is restricted to the IDE and secretory and mature ameloblasts with increasing levels of expression. *Epf_n^{-/-}* mice show severe enamel hypoplasia and excess teeth. In *Epf_n^{-/-}* teeth, proliferation of IDE cells is reduced, Sox2-expressing stem cells expand in the presumptive IDE layer, and ameloblast differentiation is blocked, resulting in no enamel formation. Using the dental epithelial stem cell line CLDE and KO mouse models, we have found that Epf_n regulates stem cell commitment to the IDE by controlling T-box1 (Tbx1), another transcription factor that maintain stem cell character by inducing Sox2 expression. We showed that in CLDE cells low levels of Epf_n expression abrogate the Tbx1-mediated Sox2 induction by interacting with Tbx1 in CLDE cells. We also found that relatively low-level Epf_n expression promotes CLDE cell proliferation, whereas high-level Epf_n expression promotes differentiation. Our results suggest that Epf_n is involved in all processes of ameloblast development from the stem cell commitment to the IDE, proliferation, cell cycle exit, and differentiation. Different levels of Epf_n expression thus dictate different Epf_n functions at different stages during ameloblast development.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

KS-2 マトリックスペプチドを用いた組織再生誘導法の開発

○野水 基義, 片桐 文彦, 保住建太郎, 吉川 大和

東京薬大 薬 病態生化

細胞外マトリックス, 特に基底膜は, 個体の発生や分化, 組織の修復あるいはがんの増殖転移に深く関与しており, 構成成分の機能や作用メカニズムの解明が注目されている. 近年, マウス肉腫基底膜の可溶化ゲルであるマトリゲルが, 細胞工学的研究において数多く用いられその有用性が証明されてきているが, マウス肉腫由来であるため臨床応用は不可能である. そこでマトリゲルに匹敵する合成バイオマテリアル, すなわち「人工基底膜」の開発が待ち望まれている. 基底膜の主役的存在で, マトリゲルの主成分でもあるラミニンは, 様々な生命現象や病態に深く関わっている多彩活性を有する巨大な分子である. 現在までに15種類のラミニン同族体が報告されており, 発生時の各段階で特異的にあるいは組織特異的に発現し様々な生命現象に関与していることが知られている. これまでに我々はラミニン同族体の中に埋め込まれている生物活性部位を同定する目的で, 3,000種類以上のペプチドを用いた網羅的解析から数多くの細胞接着活性ペプチドを同定した. これらの中に, インテグリン, シンデカン(膜貫通型プロテオグリカン), ジストログリカンを受容体とするものや, 血管内皮や神経細胞に特異的に作用するものを発見した. さらに, 皮膚や外分泌腺などの複雑な多細胞系での各々の活性ペプチドの具体的な生理機能を解明してきた. また, 受容体の異なるラミニン活性ペプチドを多糖マトリックスに複数種類再構築することにより, ペプチドの活性が相乗的に増加され, ラミニン様の活性を示すことがわかってきた. これらペプチド-マトリックスは「人工基底膜」ともいえる合成バイオマテリアルとして用いることが可能で, 組織工学や再生医療分野など幅広い応用が期待される.

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する.

Laminin active peptides conjugated matrices as a biomaterial for tissue engineering

○Nomizu M, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y

Dept Clin Biochem, Tokyo Univ Pharmacy Life Sci

Laminins are a major component of the basement membrane, a thin extracellular matrix, and have diverse biological activities. We have identified various biologically active peptides from laminins using more than 3,000 synthetic peptides. These peptides recognized various cellular receptors. We also demonstrated that peptide-conjugated polysaccharide (chitosan, alginate, and hyaluronan) matrices are useful for biomaterials. We have identified sixty biologically active peptides in the laminin-111, a major component of Matrigel. We conjugated sixty biologically active peptides onto chitosan matrices. The peptide-chitosan matrices promoted various biological activities including cell attachment, spreading, and neurite outgrowth and were categorized into eight groups depending on their biological activities. Next, we conjugated five active peptides, which showed the strongest cell attachment activity in the each group, onto a chitosan matrix. The mixed peptides-chitosan matrix significantly promoted cell attachment, cell spreading, neurite outgrowth activity. These data suggest that the mixed peptides synergistically induce laminin-like biological activities on a chitosan matrix.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

KS-3 成体神経新生における老化と細胞外マトリックスの変化

○平澤 恵理, Aurelierien Kerever, 山田 泰平

順天堂大 院医 老人性疾患病態・治療研究セ

細胞の分化, 増殖を制御する因子の一つとして, 細胞外環境が知られる. 脳の基底膜は血管, 髄膜として存在するが, 我々は, 脳室下帯 (SVZ) に存在する新規基膜様構造 fractone-血管-髄膜が構造的に連携し, 発生と成体神経新生に重要な役割を担う細胞外マトリックスネットワークとして機能すると考えている. 老化脳において神経新生能が減少することが知られるが, その原因として, fractone-血管ニッチが老化においてどのように変化しているかを検討した. 主たる成体神経新生領域である若齢 (8~10 週齢) 及び老齢 (24ヶ月齢) 脳室下帯を用いて, 老化マトリックスの構造と微細構造の特性を検討した. 老化マトリックス構成分子種を RNA 及びタンパク質の網羅的解析で示した. 老化マトリックス構成分子の糖鎖解析を行った. 老齢マウスでは fractone のサイズが優位に大きく, 数が優位に減少していた. ヘパラン硫酸鎖の免疫染色性が変化していた. RNA, たんぱく質解析, 糖糖鎖修飾解析も行い予備的知見を得た. fractone の変化に伴い, FGF の結合性や下流シグナルが変化している可能性が示唆された.

【利益相反】 特になし.

Senescence changes the extracellular matrix environment in adult neurogenesis

○Arikawa-Hirasawa E, Kerever A, Yamada T

Res Inst for Dis of Old Age, Grad Sch Med, Juntendo Univ

In the young adult mammalian brain, neurogenesis is sustained in the subventricular zone (SVZ) and the hippocampus. Although number of neural stem cells (NSCs) and neurogenesis are known to deteriorate in the aged brain, the mechanism underlying is still poorly understood. In the SVZ, specialized extracellular matrix (ECM) structures termed fractones, composed of ubiquitous ECM components including heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), contact neural stem cells and their immediate progeny. We previously demonstrated that HSPGs contained in fractones' captured growth factors, such as FGF-2 via heparan sulfate (HS) chains, and regulate neurogenesis in the SVZ. We have investigated age-associated related changes inof fractones, such as in morphology, components, posttranslational modification, and signal transduction. We Our findings suggestpropose that the regulation of HS compositions may be critical for maintaining FGF-2 signaling and neurogenesis in the aged SVZ.

Conflict of Interest: There is any COI concerning this paper.

KS-4 幹細胞をターゲットとした唾液腺再生治療の開発

○阪井 丘芳

阪大 院歯 顎治

頭頸部癌に対する放射線治療は外科的治療と同様に有効な治療法の1つである。しかしながら、放射線照射に伴う唾液腺機能障害である口腔乾燥症に対して、効果的な解決策は見いだされていないのが現状である。また自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の口腔乾燥症に対しても根本的な治療法がなく、画期的なアプローチが望まれている。本研究ではマウス唾液腺を用いて放射線照射や導管結紮による唾液腺障害モデルを作製し、まず経時的な自然再生について検討した。唾液腺再生を評価するために、腺房形態の回復と幹細胞マーカー、唾液腺マーカーの遺伝子発現の上昇を確認した。今後の臨床応用をめざして、ドラッグリポジショニングの観点から既存薬剤の再評価やサプリメントの効果判定は重要である。薬剤Pの持続的投与は、唾液腺マーカーの上昇に伴う唾液分泌量の増加と幹細胞マーカーの上昇をもたらした。また、サプリメントLの腹腔内投与は放射線照射前の唾液腺形態の維持に有効であり、放射線治療による唾液腺の損傷から腺房を保護する効果を認めた。放射線照射や導管結紮による唾液腺損傷時の形態変化を基準として、最新の知見を交えながら、再生の評価、幹細胞の維持、腺房形態の保護、唾液分泌機能の回復について議論する予定である。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Regenerative approach of salivary gland targeting stem cells

○Sakai T

Dept Oral-facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

Head and neck cancer patients treated by radiation commonly suffer from a devastating side effect known as dry-mouth syndrome, resulting from the irreversible loss of salivary gland function via mechanisms that are not completely understood. Additionally, effective treatments for Sjögren's syndrome do not yet exist. Overall, there is a limited understanding of the physiological mechanisms associated with xerostomia and hyposalivation. In this study, we used mouse models of both radiation-induced and duct ligation-affected salivary hypofunction to investigate the outcomes of morphological damage and subsequent serial regeneration in salivary glands, using salivary gland and stem cell markers. Drug P and nutritional supplement L were investigated with respect to whether they were effective at enabling regeneration. We demonstrate the recovery of both the morphology and function of salivary glands after radiation or duct ligation. Collectively, these results suggest that pretreatments of drug P and nutritional supplement L may be components of a promising therapeutic strategy for the preservation of salivary gland function in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

KS-5 脂質代謝における SCF ^{β -TRCP} ユビキチンリガーゼ複合体の役割

○犬塚 博之¹, 福島 秀文¹, 清水 康平², Wenyi Wei², 福本 敏¹

¹東北大学 院歯 先端再生医学研究セ

²Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA

ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) は、幹細胞の維持をはじめ、細胞周期、免疫応答、代謝など様々な細胞機能の調節に関与している。SCF (Skp1-Cullin1-F-box protein) E3 リガーゼ複合体は、数百種類が報告されている E3 ユビキチンリガーゼの中でも最も機能に関する解析が進められており、ヒトでは 69 種類の複合体が存在すると考えられている。その中でも β -TRCP を基質受容体サブユニットとして包有する SCF ^{β -TRCP} 複合体は、膜受容体、酵素、核内タンパク質など幅広い分子種の基質に対し、リン酸化の修飾を受けたコンセンサスな結合配列 (リン酸化デグロン) を認識して結合後、ポリユビキチン鎖を付加することによりそれらをプロテアソーム依存的な分解に導く。その生物学的機能として、細胞周期の進行や、NF- κ B/Wnt シグナルの活性化に重要な役割を担っていることが報告されてきた。

我々は、SCF ^{β -TRCP} 複合体のさらなる生理機能解明を目的として、 β -TRCP リン酸化デグロン配列を特異的に認識する抗体を用いた新規プロテオミクスアプローチにより新規 β -TRCP 基質の探索を行った。スクリーニングの過程で単離された基質候補分子の解析から、 β -TRCP が mTORC シグナル関連分子の分解を介して脂質合成を促進している可能性が示唆された。また、高脂肪食摂取後にコントロールマウスで観察される脂肪肝の発症が β -TRCP1 ノックアウトマウスで顕著に抑制されることから、 β -TRCP の生体内における脂質代謝調節因子としての機能の重要性が明らかとなった。

現在、今回見出された β -TRCP/mTORC シグナルの脂質代謝制御機構を、幹細胞分化の際の脂質代謝プログラムの転換に応用することを目的に研究を進めている。 β -TRCP/mTORC シグナル制御を介した UPS による脂質代謝プログラムの転換が可能となれば、骨髄間葉系幹細胞、歯髄幹細胞や脂肪組織由来幹細胞などの効率的な分化誘導、ひいては骨や血管、心筋、脂肪の再構築などの再生医療への応用にもつながると考えられる。今回は、UPS による脂質代謝プログラム制御の分子機構を中心に紹介したいと考えている。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言いたします。

SCF ^{β -TRCP} E3 ubiquitin ligase promotes lipid synthesis in an mTORC-dependent manner

○Inuzuka H¹, Fukushima H¹, Shimizu K², Wei W², Fukumoto S¹

¹Center for Adv Stem Cell and Regenerative Res, Tohoku Univ

²Beth Israel Deaconess Med Center, Boston, MA

The ubiquitin-proteasome system (UPS) regulates diverse cellular processes including stem cell maintenance, cell cycle progression, cell differentiation, and metabolism. The SCF ^{β -TRCP} E3 ubiquitin ligase complex plays pivotal roles in normal cellular physiology and under pathophysiological conditions. Identification of β -TRCP substrates is therefore critical for a better understanding of SCF ^{β -TRCP} biology and function. Here, we have conducted screens for β -TRCP substrates utilizing various proteomics approaches and identified multiple β -TRCP substrates that are involved in the mTORC-mediated lipogenic pathway, suggesting that β -TRCP function is associated with lipid homeostasis. In support of this finding, we found that β -TRCP1 knockout mice were protected from high fat diet-induced steatosis. These data suggest that SCF ^{β -TRCP} plays critical roles in promoting lipid synthesis and also provide insights into potential approaches for enhancing transdifferentiation effects of mesenchymal stem cells by modulating the β -TRCP/mTORC-dependent metabolic pathway.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

CS-1 歯学研究における基礎と臨床のシグナル伝達

○山口 朗

東歯大 口腔科学研究セ, 日本学術会議会員

歯科基礎医学における重要な使命の一つは、その研究成果を臨床へ還元させることである。医学、歯学でトランスレーショナルリサーチ、橋渡し研究という言葉が用いられて久しいが、歯科医学においてはそれらが実践された優れた例は未だに少なく、この点を克服することは、今後、歯科医学をさらに発展させるために極めて重要なポイントになる。昨年、日本学術会議歯学委員会基礎系歯学分科会が行った我が国の歯科大学・大学歯学部における「基礎系研究分野における教員の出身学部及び大学院生数に関するアンケート調査」で、基礎系研究室では臨床系研究室から多くの大学院生の研究委託を受け、基礎-臨床の連携を図っていることが明らかになった。そのため、トランスレーショナルリサーチを推進するための基本的な研究体制はある程度構築できていると予想される。次のステップとして、これらの連携におけるシグナル伝達をさらに活性化し、歯科臨床に有用な質の高い研究成果を産み出すことが重要であろう。本シンポジウムでは、以上のような我が国の歯科医学の背景を鑑み、「免疫」と「疼痛」の2つのトピックスに関して、各テーマの基礎と臨床のシンポジストの先生方に基礎・臨床連携の現状と問題点を述べていただき、歯科医学におけるトランスレーショナルリサーチの新たな展開を図ることを目的とする。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Signal transduction between oral biology and clinical dental research

○Yamaguchi A

Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll

One of important mission of oral biology is to reciprocate its results to clinical dentistry. There have been few successful samples of translational researches in dentistry, and this is a critical problem to extend dental research in future. Committee of basic science of oral sciences in the Science Council of Japan surveyed a diversity of faculty members and graduate school students in Japanese dental schools. This survey revealed that many graduate school students belonging to clinical departments conducted their researches by collaboration with basic science departments. Although this research system will contribute to progress translational research, we should make more intimate and efficient signal transduction system between basic and clinical sciences to achieve high-quality translational research. In this symposium, we focused on two research fields, "Immunology" and "Pain", to explore ideal translational researches in dentistry. Active scientists in these research fields will provide the topics based on their own research as well as the difficult issues to achieve translational research in their own research field. We hope that this symposium will provide an opportunity to make a new era of translational research in dentistry.

Conflict of Interest: The author has no conflict of interest to declare.

CS-2 脳由来神経栄養因子による歯周組織再生

○栗原 英見

広大院医歯保 歯周病態

多くのシグナル分子が歯周組織再生への応用を目指して研究されてきた。例えば、骨形成タンパク2 (BMP-2), 繊維芽細胞増殖因子 (FGF), 血小板由来増殖因子 (PDGF), インスリン様増殖因子 (IGF) などが歯周組織再生能力があると報告され、一部は市販されている。私どもは、脳由来神経栄養因子 (BDNF) が歯周組織を再生させる能力があることを見出した。BDNFは神経栄養因子の一つであり、神経系細胞、非神経系の細胞に様々な作用を示す。神経栄養因子には2種類の異なる受容体がある。その一つはTrkで、もう一つはp75である。p75は神経栄養因子に共通する低親和性の受容体であり、TrkにはTrkA, TrkBとTrkCがある。Trkは細胞生存、分化などの刺激を生み、p75は細胞死を誘導する。すなわち、同じリガンドが細胞生存と細胞死を誘導できる。真の歯周組織再生にはセメント質と歯周靭帯の再生がカギとなる。一般的に歯肉上皮細胞は、セメント質再生が起こるべき歯根面に対峙している歯肉の創面を覆うことによって、歯周組織再生を妨げる。歯肉上皮の強固な結合と歯肉上皮細胞の増殖抑制が歯周組織再生には極めて重要である。BDNFはTrkBを介して歯周靭帯細胞の増殖、分化を誘導する一方で、p75を介して歯肉上皮細胞の増殖を抑える。ビーグル犬はサルを用いた動物実験で、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体は歯肉上皮細胞の侵入がない歯周組織再生を促進した。現在、国際共同の臨床治験がアメリカ合衆国とEUで計画されている。

【利益相反】 演者は利益相反状態にあります。

Periodontal tissue regeneration with BDNF (brain-derived neurotrophic factor)

○Kurihara H

Dept Periodont Med, Div Appl Life Sci, Inst Biomed Health Sci, Hiroshima Univ

Many signaling molecules, such as bone morphogenetic protein-2, fibroblast growth factor, transforming growth factor, platelet-derived growth factor, insulin like growth factor, have been reported to have potential to regenerate periodontal tissue. We have found that Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has strong potential to regenerate periodontal tissue. BDNF is a member of neurotrophins that have various effects on neuronal and non-neuronal cells. There are two different types of receptors for neurotrophins. One of them is Trk, high affinity receptor for neurotrophin and another is p75. p75 is common low affinity receptor for neurotrophins and there are different types of Trks, TrkA, TrkB and TrkC. Trk makes survival signal and p75 makes death signal. Therefore, the same ligand can induce cell death and survival. Cementum and periodontal ligament regeneration is key for real periodontal tissue regeneration. Generally, gingival epithelial cells inhibit periodontal regeneration by covering of wound surface faced to tooth root where cementum regeneration is expected. Tighten gingival attachment and inhibition of epithelial cell growth is very important for periodontal regeneration. BDNF can inhibit gingival epithelial cell growth through p75, whereas BDNF can enhance periodontal ligament cell growth and differentiation through TrkB. Animal studies with beagle dogs and non-human primates have showed that the complex of BDNF/high molecular weight hyaluronic acid significantly enhanced periodontal tissue regeneration without epithelial cell invasion. The clinical trial is planning in US and EU.

Conflict of Interest: The author declares conflict of interest associated with this manuscript.

CS-3 共刺激分子研究 — from bench to bedside and back to bench —

○東 みゆき

医科歯科大 院医歯 分子免疫, 日本学術会議会員

T細胞の活性化には, MHC/ペプチドの TCR への結合による第1シグナルと抗原提示細胞とT細胞との直接の相互作用による第2シグナルが必要であるという現在の概念により近い2シグナルモデルが, 1987年にRH Schwartzらによって提唱されてから約30年が経とうとしている。この間に第2シグナルの実態は, Costimulation と呼ばれるCD28に代表される共刺激分子であることが明らかになり, また第2シグナルには, 正と負の共刺激分子が存在し, 反応の場と時間という因子を加えて時空間的に巧妙なT細胞活性化の調節がされていることが明らかになった。さらに, 正および負の共刺激分子を標的とする抗体医薬や分子標的薬が開発され, 免疫抑制剤あるいは癌免疫療法剤として, 臨床応用されるに至っている。特に, 免疫チェックポイント分子と呼ばれる負の共刺激分子PD-1およびCTLA-4を標的とした癌免疫療法は, これまでのがん治療戦略を大きく変えつつある。と同時に, 相反する機能をもつエフェクターT細胞と制御性T細胞が共に共通の共刺激を必要としていること, CTLA-4やB7-H1などでは, 分子発現による内在性の変化に対しては阻害抗体の投与効果が得られないこと, 免疫関連有害事象への対応, 有効症例選択のためのバイオマーカー検索など臨床現場から基礎研究に逆に投げ返された課題も多い。本講演では, これまでの共刺激分子研究の流れを紹介しながら, 歯学における基礎研究と臨床研究の連携について考えてみたい。

【利益相反】 著者は利益相反にありません。

Costimulation Research —from bench to bedside and back to bench—

○Azuma M

Tokyo Med Dent Univ, Grad Sch Med Dent Sci; Member, Science Council of Japan

A modern concept of “Two signal model of T cell activation” has been proposed by RH Schwartz in 1987 and three decades have passed. During the period, we have deepened our understanding on costimulation; 1) a potent costimulation is provided by CD28-CD80/CD86 pathway, 2) positive and negative costimulation exist, and 3) T cell activation is fine-tune controlled in a temporal-spatial manner. Now biological products targeting cosignal molecules have been applied in a number of clinical setting for immunosuppressant agents and cancer immunotherapy. Especially, immune checkpoint inhibitors such as humanized mAbs against CTLA-4 and PD-1 have greatly changed a standard treatment strategy for cancer. Concurrently, a number of issues have been raised from clinical side to basic researchers; 1) both effector T cells and regulatory T cells that have opposite function require common cosignals 2) blocking antibodies are not effective to the molecules that possess cell intrinsic function (e.g., CTLA-4 and B7-H1) 3) proper care for immune related adverse effects 4) biomarker searching for selecting patients who receive treatment benefit. In this talk, I will highlight up-date costimulation research and clinical application, and discuss cross-link between basic and clinical research in the field of oral sciences.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

CS-4 口腔顔面痛疾患に対する治療の将来に向けた方向性：基礎研究からのフィードバックに希望はあるか？

○矢谷 博文

阪大 院歯 顎口腔機能再建 クラウンブリッジ補綴, 日本学術会議連携会員

痛みは、他のどんな出来事よりも人に動機を与える不愉快な経験である。文明国においては国民の3分の1が何らかの痛みを有しているとも言われている。疼痛疾患が国家に与える社会経済学的損失は莫大である。したがって、痛みの管理は、医療従事者の第一の関心事であるといえる。疼痛発生源と疼痛感受部位が一致する急性痛の管理は非常に容易である。疼痛の原因は明白であり、侵害受容性インパルスを抑制することにより、患者を痛みから解放することができる。しかしながら、痛みの原因はいつも明白であるわけではない。時には、痛みの原因は消失しているにもかかわらず依然として慢性的な痛みが続くこともありうる。このような慢性痛に関連したメカニズムは原因のはっきりした急性痛とはまったく異なっており、いまだに理解の難しいものである。歯科医師にとって、齶蝕のように原因のはっきりした痛みを管理することは困難ではないが、持続的な自発痛や器質的な原因の見つからない痛みに出会うと、臨床家は混乱し、頭を悩ませることになる。臨床家が理解の困難な痛みを効果的に管理するためには、不愉快な経験を創り出す痛みのメカニズムに対する基礎的な知識を有していなければならない。痛みという医療におけるもっとも複雑な問題に対する解決の道筋を見出すためには、日々進歩する基礎研究の成果に常に目を向けていることが必要である。

本講演では、最新の基礎研究の成果を臨床に着実に応用するために、基礎研究に何を期待すべきかを明らかにするとともに、口腔顔面痛治療の将来の方向性を探ってみたい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Future directions of clinical treatment of orofacial pain disorders: Any hope for feedback from basic research?

○Yatani H

Dept Fixed Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

Pain is an unpleasant experience that perhaps motivates the individual far greater than any other life experience. Nearly a one-third of the population in industrialized nations suffer to some extent from chronic pain. Pain disorders give huge socioeconomical loss to a state. Therefore, clinical management of pain is a primary concern of health professionals. The management of acute pain where pain site coincides with pain source is very easy. The cause of those pain is obvious, and its management consists of either suppressing the passage of nociceptive impulses or making the patient insensible to them. The cause of clinical pain, however, may not be easily identified. In fact in some cases the initiating cause may no longer even be present, but the pain may still continue. The mechanisms that are involved with clinical pain are certainly not as well understood. As a rule, pain from an obvious cause such as tooth caries is managed with no difficulty at all. But when a pain occurs spontaneously or without evidence of structural cause, the clinician may become confused and frustrated. For the clinician to effectively manage clinical pain, he or she must have a basic understanding of the mechanisms that create this unpleasant experience. We need to be constantly accessing current research findings that may shed new light on this most complex problem.

Conflict of Interest: The author has no conflict of interest to declare.

CS-5 口腔顔面痛発症機構解明と臨床応用への可能性

○岩田 幸一

日大 歯 生理, 日本学術会議連携会員

三叉神経損傷や口腔顔面領域の炎症は、口腔内器官や顔面皮膚に強い慢性痛を引き起こすことが知られている。神経損傷や炎症は末梢神経系に対して強い興奮性の増強を誘導し、神経興奮だけでなく三叉神経節における様々な分子の合成を促す。神経節においてはニューロンの興奮性の増強だけでなくグリア細胞であるサテライト細胞の活性化も誘導される。活性型サテライト細胞あるいは過興奮を起こした神経節細胞からは様々な物質が放出されて神経節細胞に作用することにより、神経節細胞の興奮性はさらに増加する。このような一連の過程によって一次ニューロンは感作され、異常興奮が持続する。さらに、一次ニューロンにおける異常興奮は三叉神経脊髄路核あるいは上部頸髄のニューロンに伝えられ、二次ニューロンの興奮性も増加する。三叉神経脊髄路核や上部頸髄にはニューロンだけでなくミクログリアやアストロサイトあるいはオリゴデンドログリアなどのグリア細胞が存在し、これらのグリア細胞の活性化が誘導される。これまでの多くの研究においてグリア細胞はニューロンの栄養あるいは支持細胞として知られていたが、最近の研究で活性型グリア細胞がさまざまな物質を放出し、ニューロン活動の変調を誘導することが明らかになってきた。このように、末梢神経系および中枢神経において、ニューロンとニューロンあるいはニューロンとグリア細胞はお互いに機能連関を形成しニューロンの活動性を変調させ、最終的に痛覚異常を引き起こす可能性が報告されている。以上の様な研究結果から、最近ではニューロンとニューロンあるいはニューロンとグリア細胞間の機能連関をコントロールすることが疼痛異常を治療する手段の一つとして考えられるようになりつつある。本シンポジウムでは我々がこれまでに得てきた研究結果を紹介し、臨床応用への可能性についてディスカッションしたい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Orofacial pain its underlying mechanism and clinical relevance

○Iwata K

Dept Physiol, Sch Dent, Nihon Univ

It is well known that trigeminal nerve activity is strongly enhanced following trigeminal nerve injury or orofacial inflammation. Under these pathological conditions, various molecules are generated in trigeminal ganglion (TG) neurons associated with hyperexcitability of TG neurons. Satellite cell activation is also caused in association with the enhancement of TG neuronal activity. TG neurons are sensitized after that, and the excitability of TG neurons is strengthened, and then a barrage of action potentials are generated and conveyed to the trigeminal spinal nucleus caudalis (Vc) and upper cervical spinal cord (C1-C2). Vc and C1-C2 neurons become hyperexcitable following sensitization of TG neurons associated with trigeminal nerve injury or orofacial inflammation. Microglia and astrocytes are also activated following hyperactivation of Vc and C1-C2 neurons. Various molecules are generated and released from these glial cells, and those are involved in modulation of Vc and C1-C2 neuronal excitability. Neuron-neuron and Neuron-glia interaction is thought to be a key mechanism comprising in orofacial pain hypersensitivity associated with trigeminal nerve injury or orofacial inflammation. In this symposium, I would like to discuss whether these tools can be applied for the orofacial pain treatments.

Conflict of Interest: The author has no conflict of interest to declare.

MSA-1 In vivo イメージングを使った細胞内シグナルと生体機能の同時解析：唾液腺腺房細胞の Ca^{2+} 応答と唾液分泌

○谷村 明彦, 根津 顕弘, 森田 貴雄

北医療大 歯 薬理

ライブセルイメージング技術は、細胞内の分子動態を解析する方法として開発され、新しい蛍光センサーや光学系によって急速に進歩してきた。またウイルスベクターや遺伝子改変動物の活用によって、臓器や個体レベルでの機能解析が可能になってきた。我々はラット顎下腺開口部から逆行性にアデノウイルスベクターを注入し、非侵襲的に蛍光センサーを発現させた腺房細胞を使った in vivo Ca^{2+} イメージング技術を確立した。

この研究で主に用いている超高感度 Ca^{2+} センサー YC-Nano50 は、 Ca^{2+} に対する親和性が高く ($K_d \sim 50$ nM)、蛍光比の変化率が大きな (in vivo で約 2 倍) FRET 型の Ca^{2+} センサーである。この Ca^{2+} センサーを唾液腺腺房細胞に発現させることによって、生きた動物を使って、薬物刺激や神経刺激による唾液腺の Ca^{2+} 応答の解析が可能になった。また唾液腺開口部に挿入したカニューレ内の唾液の流れによって生じる微小な圧力を測定することによって、 $3 \mu\text{L}/\text{min}$ の唾液分泌を 1 秒間隔で連続的にモニターすることに成功した。さらにレーザースペckル血流計を使った血流イメージングによって、唾液分泌と唾液腺血流の解析を行っている。

この実験系を用いた解析によって、薬物刺激と神経刺激による唾液腺の反応の違いや、分泌刺激薬による Ca^{2+} 応答の違いなどが明らかになってきた。また、腺房細胞の Ca^{2+} 応答から唾液分泌開始までのタイムラグに基づいて、分泌に必要な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の算定を試みている。さらに、アセチルコリン刺激によって唾液腺全体で同調した Ca^{2+} オシレーションが発生することや、この Ca^{2+} オシレーションにアンジオテンシン II やトロンボキサン A_2 を介する血管収縮が関与することが示唆されている。本シンポジウムでは、この実験系で得られた成果に加えて、技術的な特徴と発展性について議論したい。

【利益相反】 著者は利益に相反が無いことを宣言する。

In vivo imaging analyses for monitoring the intracellular signaling with biological functions: monitoring of Ca^{2+} responses in salivary acinar cells with salivary secretions and blood flow

○Tanimura A, Nezu A, Morita T

Div Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Fluorescent molecular imaging techniques have enabled characterization of the localizations and dynamics of particular molecules at the cellular and subcellular levels. Advances in fluorescent indicators, in particular genetically encoded indicators, have contributed to the development of fluorescent imaging methodologies for live organs and animals. We developed an intravital imaging system for monitoring Ca^{2+} responses in rat submandibular gland acinar cells in live animals by retrograde ductal injection of adenoviral vectors expressing the genetically encoded Ca^{2+} indicator, YC-Nano50. We also employed a fibre optic pressure sensor and a laser speckle imaging flowmeter for the real-time monitoring of salivary flow and blood flow, respectively.

We succeeded in monitoring acetylcholine (ACh)-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and salivary secretions, simultaneously, in a concentration-dependent manner. This system allowed us to estimate the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that require for inducing the salivary secretions. ACh induced a tissue-wide synchronization of Ca^{2+} oscillations with the fluctuation of the secretion and the blood flow. Diverse effects of different agonists and neuronal stimulations on Ca^{2+} responses and salivary secretions were also observed. We will discuss about the applicability of this system, and future expansion into other biological systems.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

MSA-2 2光子顕微鏡を用いた骨恒常性維持機構の *in vitro* 解析

○疋田 温彦

東大 院医 軟骨・骨再生医療寄付講座（富士ソフト）

乳腺組織、血管などの生体組織を、介入および解析の比較的容易な *in vitro* で再構築し、生体内での現象の解析や病態の解明、薬剤スクリーニングなどに利用しようとする試みが以前より報告されている。

骨恒常性維持機構の根幹である骨リモデリング過程は骨基質内の骨細胞ネットワーク、基質上の骨芽細胞、破骨細胞が関連する現象であると考えられる。これを *in vitro* で解析するためにはこの様な複雑な環境を再現し、長期に渡り同一部位を観察する系の構築が必要である。

我々は、骨芽細胞を分化培養させることで、Cuboidal な成熟骨芽細胞による石灰化基質形成を経て、基質表面に bone lining cell が、基質内に骨細胞が出現することを見出した。この骨芽細胞長期培養系において破骨細胞を共存培養し、2光子顕微鏡により同一部位を定期的に観察することにより、破骨細胞による基質の吸収、吸収窩への骨芽細胞の動員、骨芽細胞による吸収窩の再充填という一連の現象を細胞レベルで捉えることに成功した。この結果は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が同一部位で生じること、すなわちカップリングが実際に起こることを細胞レベルで証明するものである。また、我々の確立した系は、骨リモデリング過程や、カップリングを含む骨リモデリング過程のメカニズム解析に有用であると共に、これらの過程に影響を与える薬剤のスクリーニングなどへも応用可能であると考えられる。

【利益相反】 著者は利益相反状態にあります。（寄付講座所属）

In vitro analysis of homeostatic mechanism of bone using two-photon microscopy

○Hikita A

Dept Cartilage & Bone Regeneration, Grad Sch Med, The Univ Tokyo

It has been reported that tissues such as mammary ducts and blood vessels were reconstructed *in vitro* where intervention and analysis are easy, and they were applied for analyses of phenomena in living tissues, elucidation of pathology and drug screening.

Bone remodeling is a fundamental process in the bone homeostatic mechanism in which osteocytes network in bone matrix, osteoblasts and osteoclasts on the matrix are involved. To analyze this *in vitro*, it is needed to reconstruct a complexed environment and to observe same regions for a long period.

We found that bone lining cells and osteocytes appeared on and in the calcified nodules following matrix synthesis by cuboidal osteoblasts during osteoblast differentiation culture. By co-culturing osteoclasts in this long-term culture and by temporal observation of same region using 2-photon microscopy, we could capture sequential phenomena such as matrix resorption by osteoclasts, recruitment of osteoblasts and replenishment of pits by osteoblasts.

This is an existence proof of coupling in which bone resorption and formation occur in the same site, at cellular level. This system will be applicable to the analysis of the mechanisms of bone modeling and bone remodeling including coupling process, and screening of drugs which affect these processes.

Conflict of Interest: The author declares conflict of interest associated with this manuscript (Affiliation with an endowed chair from a company).

MSA-3 マルチモーダル超解像法を用いた骨系細胞の機能解析

○飯村 忠浩^{1~4}, 李 智媛¹

¹愛媛大 プロテオサイエンスセ バイオイメージング

²愛媛大 学術支援セ 病態機能解析

³愛媛大 院医

⁴愛媛大病院 人工関節セ

光学顕微鏡の分解能は、当てる光（励起波長）の約2倍であることが知られている。したがって可視光を使えば、分解能はせいぜい300-200 nmである。つまり、この距離よりも接近した構造や分子同士は、従来の光学顕微鏡（共焦点や多光子励起顕微鏡を含む）では、分解できない。近年、様々な技術革新により、この分解能の限界を超える蛍光顕微鏡が開発され、まとめて「超解像顕微鏡」と呼ばれている。2014年のノーベル化学賞が、超解像顕微鏡技術を開発した3人、Eric Betzig, W.E. Moerner と Stefan Hell に与えられたのは記憶に新しい。また、各社から、共焦点レーザー顕微鏡ベースの「分解能強化：Enhanced Resolution」型の顕微鏡も出されており、分解能の著しい向上が期待できる。さまざまな超解像法があるが、原理や解像度、利点や応用限界などがあり、それらの技術的 Trade-Off をどのように埋め合わせるかが、研究を進める上で重要な課題になる。

私たちの研究グループでは、ER法、構造化照明法(SIM: Structured Illumination Microscopy)、ローカライゼーション法(STORM: Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)など、原理と分解能の異なる顕微鏡によるマルチモーダルな解析法で、骨芽細胞や破骨細胞の機能解析を進めている。このような、いわばマルチモーダル超解像法から、分子レベルでの研究展開について、紹介したい。

【利益相反】 著者は利益相反が無いことを宣言する。

Functional analyses of bone cells by integrative approaches of multimodal super resolution microscopy

○Iimura T^{1~4}, Lee J-W²

¹Ehime Univ, Proteo-Science Center (PROS)

²Ehime Univ, Advanced Research Support Center (ADRES)

³Ehime Univ, Grad Sch Med

⁴Ehime Univ Hosp, Artificial Joint Integrated Center

The resolution of conventional light microscopy is limited due to the diffraction of light. The attainable resolution is approximately a half width of the wave length of emission light, which reaches 300-200 nm. Super-resolution microscopy is a form of light microscopy whose techniques allow images to be taken with a higher resolution than the diffraction limit mentioned above. It is memorable that the Nobel Prize in Chemistry 2014 was awarded to Eric Betzig, W.E. Moerner and Stefan Hell for the development of super-resolved fluorescence microscopy.

Recently major microscopic companies have developed “Enhanced Resolution (ER) Microscopy based on their basic confocal microscopy systems. Each of super resolution technique has its own advantages and technical limits, therefore, it is relevant to consider how accommodate these trade-offs to acquire novel bio-medical insights.

Our research group has applied multimodal super-resolution imaging with ER Structured Illumination Microscopy (SIM), and Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) to investigate cellular functions of bone cells such as osteoclasts and osteoblasts. In this seminar, our integrative approaches of the multimodal super resolution imaging and molecular biological analyses will be introduced.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

MSA-4 電子顕微鏡による親水環境での組織・細胞・分子の構造観察

○佐藤 主税¹, 海老原達彦¹, 奥田 賢一², 川田 正晃³, 佐藤 真理¹, 山澤徳志子⁴,
水之江義充², 杉本 真也²

¹産総研 バイオメディカル 構造生理研究グループ

²慈恵医大 細菌

³産総研 機能材料コンピューショナルデザイン

⁴慈恵医大 分子生理

走査電子顕微鏡と透過電子顕微鏡を用いて、親水環境で細胞と分子を直接観察する研究を進めてきた。20年近くに渡ってクライオ透過電顕(TEM)を用いた3次元構造決定法の開発を行い、イオンチャンネル・受容体・細胞骨格・酸化ストレスセンサー等のタンパク質の構造を決定してきた[1][2]。現在、これらタンパク質が、他のタンパク質とさらなる複合体を形成する高次構造の決定を行っている。しかし、それら複合体には、細胞外に取り出し精製することが難しいものも多く、常にこれら高次構造を細胞内で直接観察できないだろうかという課題に直面してきた。その解決のために、走査電子顕微鏡を倒立させ、電子線を透過できるSiN薄膜越しに水中の細胞を観察する大気圧走査電子顕微鏡ASEMを開発した[3]。SiN膜上2-3micro meterの厚さが観察でき、膜近くでの分解能は8nmである。サンプルは固定・染色するだけで水中でそのまま観察できる。本顕微鏡では、水中で抗原性が保存されるため、抗体を選ばない免疫電顕が可能である。また、細胞のみならず組織も、薄膜上に置くだけでそのまま観察することができる[4]。組織観察では、胃や十二指腸の表面に様々な細菌が観察された。また、細菌が形成するバイオフィルムを水中のより自然な環境下で免疫電顕等の手法を駆使して観察した[5]。さらに、これら顕微鏡法を用いて唾液腺や骨関連細胞等の観察も行ったので結果を報告したい。今後、ASEMと単粒子解析の両方法を融合させ解析することで、生体機構のより統合的な理解を目指したい。

[1] Sato et al., Nature 409, 1047-1051 (2001) [2] Yazawa et al., Nature 448(7149), 78-82 (2007)

[3] Nishiyama et al., J. Struct. Biol. 169, 438-449 (2010) [4] Memtily et al., Int. J. Oncol. 46, 1872-1882 (2015) [5] Sugimoto et al., Scientific Reports 6, 25889 (2016)

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Electron microscopy of tissues, cells and molecules in hydrophilic environment

○Sato C¹, Ebihara T¹, Okuda K², Kawata M³, Sato M¹, Yamazawa T⁴, Mizunoe Y²,
Sugimoto S²

¹Biomed-sps AIST

²Dept Bacteriol, The Jikei Univ Sch Med

³Cd-fmat AIST

⁴Dept Mol Physiol, The Jikei Univ Sch Med

Transmission electron microscopy (TEM) single particle analysis (SPA) determines the structures of proteins from their projections. We have developed SPA and successfully determined the structures of purified protein complexes, including ion channels, receptors, cytoskeletons and oxidative stress sensors [1][2]. For in-solution observation of cells in natural aqueous environment, we have developed Atmospheric Scanning EM (ASEM), realizing observation of water-immersed cells. The resolution of ASEM was 8 nm near SiN membrane [3]. ASEM realizes high throughput immuno-EM of cells without hydrophobic treatment, and makes it possible to observe intracellular supermolecular-complex formations: axonal segmentation mechanism in primary culture neurons. Immuno-electron microscopy of megakaryocyte, bacteria, mycoplasma, rubella virus, ES cell and immuno-dendritic cell in aqueous solution

were performed using ASEM; fine structures of biofilms formed by bacteria were successfully observed [4]. Moreover, protein micro-crystals and tissues [5] were imaged with ASEM. Using ASEM and SPA, we aim to merge molecular and cellular level studies for comprehensive understanding of cells.

[1] Sato et al., Nature 409, 1047–1051 (2001) [2] Yazawa et al., Nature 448(7149), 78–82 (2007)
[3] Nishiyama et al., J. Struct. Biol. 169, 438–449 (2010) [4] Sugimoto et al., Scientific Reports 6: 25889 (2016) [5] Memtily et al. Int J Oncol 46: 1872–1882 (2015)

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

MSB-1 Oral microecosystem —Listen to the silent majority—

○Nobuhiro Takahashi

Div Oral Ecol Biochem, Dept Oral Biol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Recent advances in OMICS science have led to a new era in oral biofilm research. Metagenomics has revealed that the oral biofilm consists of over 500 species of microorganisms, while metabolomics has shown that these bacteria share several common metabolic systems that are specific to particular sites in the oral cavity and create a microecosystem, where they harmonize metabolically and remain “healthy” as members of the indigenous microbiota. However, if the microecosystem becomes more acidogenic/aciduric it can induce caries, while if it acquires more proteolytic/amino acid-metabolizing properties, it can cause gingivitis/periodontitis. Highly pathogenic bacteria have been detected at diseased sites, such as mutans streptococci in caries lesions and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal lesions, and consequently are regarded as disease-specific bacteria. However, our recent research suggests that major but not highly pathogenic bacteria are also involved in the disease process. In the caries process, non-mutans streptococci and *Actinomyces* species might initially create an acidic environment that enables the initial caries formation and subsequently promotes colonization by mutans streptococci, while *Fusobacterium* and *Prevotella* species might create a neutral pH and a protein/amino acid-rich environment and facilitate colonization by *Porphyromonas gingivalis*. These bacterial groups are not highly pathogenic and are even commonly found at healthy sites in the oral cavity. In other words, they represent “the silent majority” of microorganisms in the oral cavity. While such bacteria might contribute to the stability of the indigenous microecosystem in normal conditions, they can become pathogenic in response to environmental alterations in the oral cavity and subsequently induce oral diseases and microbial shifts. Listen to the silent majority; they might provide an insight into the maintenance and enhancement of a “healthy” indigenous microecosystem in the oral cavity.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

MSB-2 *Scardovia wiggsiae* and its potential role as a caries pathogen

○Christine Kressirer, Anne Tanner

The Forsyth Institute, Cambridge, MA, USA

Studies have shown that while *Streptococcus mutans* is strongly associated with childhood caries it is not always detected in disease sites. Clinically, *Scardovia wiggsiae* has been significantly associated in a population with severe-early childhood caries (SECC) in addition to *S. mutans*. Further, in the SECC population *S. wiggsiae* was caries-associated in the absence of *S. mutans*. In initial caries, *S. wiggsiae* and *S. mutans* were both elevated in white spot lesions in adolescents with fixed orthodontic appliances.

In *in vitro* studies, *S. wiggsiae* is acidogenic and acid-tolerant. Multiple isolates of *S. wiggsiae* from children with SECC were highly acidogenic and strains were isolated at significantly higher frequency from a low pH, rather than neutral pH agar. The acid tolerance of selected isolates was confirmed. *S. wiggsiae* isolates were acidogenic from several sugars at low initial pH values, and were not arginine deiminase positive, characteristics consistent with cariogenic potential of this species.

Cariogenicity of *S. wiggsiae* was tested *in vivo* in a rat animal model in parallel with *S. mutans*. While *S. wiggsiae* as a single inoculation showed minimal caries induction, when co-infected with *S. mutans*, there was significant cavity production, and *S. wiggsiae* was observed invading dentin tubules.

These studies indicate that *S. wiggsiae* has several key cariogenic characteristics. It is significantly associated with advanced and initial caries in children. *S. wiggsiae* produces acid to lower pH at neutral and low pH starting conditions, and is acid tolerant. In combination with *S. mutans*, *S. wiggsiae* was detected in caries in an animal model. Together, these data suggest that *S. wiggsiae* has many of the characteristics of a caries pathogen.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

MSB-3 The strategy for oral biofilm —The best use of oral *Veillonella*—

○Izumi Mashima^{1,2}, Citra Fragrantia Theodora², Hiroshi Miyakawa², Futoshi Nakazawa²

¹Postdoctoral Fellow of JSPS

²Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Oral biofilm has a complex 3D structure with many bacterial species and shows antibiotic and immune resistance. These biofilm formations make prevention and cure difficult in dental caries and periodontal diseases.

Streptococcus is irresistible majority in oral microbiome and it has been known as initial colonizer in the oral biofilm formation. Also, *Veillonella* isolated frequently from the human oral cavity was reported to play important roles in oral biofilm formation as early colonizer. However, the underlying mechanism has not been clarified yet.

In our recent study, metagenome analysis was studied by using saliva from 140 children subjects. Oral *Veillonella* was the second majority in these microbiomes next to oral *Streptococcus*. The distribution and frequency of oral *Veillonella* at species level were also examined by using various samples from human oral cavities. As the results, the predominant species oral *Veillonella* was different for oral sites, and it was suggested that there were the country- or age-specific differences in the distribution and frequency of oral *Veillonella*.

Through these studies with oral *Veillonella*, we established the novel oral *Veillonella* species, *Veillonella tobetsuensis*, named after Tobetsu town where our university is located. *V. tobetsuensis* had the remarkable ability to promote the biofilm formation. Furthermore, several strains which could not be classified in any of the established *Veillonella* species were isolated in these studies. Now these isolates are studied in sequences analysis of housekeeping genes and will be proposed as novel species of oral *Veillonella* in near future.

To clarify the mechanism of biofilm formation, we focused on the quorum sensing (QS) system of *V. tobetsuensis* since it is known that QS with autoinducers (AIs) regulates biofilm formation, production of virulence factors and antibiotic resistance.

Our current results showed that *V. tobetsuensis* produced 3 types of AI-like substances. Moreover, when the effects of these substances on biofilm formation were examined, the amounts of biofilm changed according to the effect of these AI-like substances.

In future, these AIs will be applied in clinical dentistry as effective regents to inhibit oral biofilm formation at the early stage with unchanging oral flora. We believe that these studies will be helpful for treatments and prevention of dental caries and periodontal diseases.

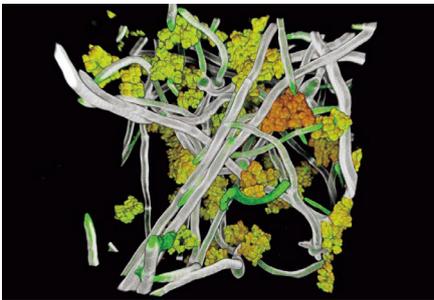
Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

MSB-4 Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity

○Gordon Ramage

Oral Sci Res Group, Glasgow Dent Sch, Sch Med, Dent Nursing, Univ Glasgow, UK

The role of polymicrobial biofilm infections in medicine is becoming more apparent. Increasing numbers of microbiome studies and deep sequencing has enabled us to develop a greater understanding of how positive and negative microbial interactions influence disease outcomes. An environment where this is particularly pertinent is within the oral cavity, a rich and diverse ecosystem inhabited by both bacteria and yeasts, which collectively occupy and coexist within various niches as biofilm communities. Studies within this environment have however tended to be subject to extensive independent investigation, in the context of either polymicrobial bacterial communities or yeast biofilms, but rarely both together. It is clear however that they are not mutually exclusive. This lecture will present data from a range of studies to demonstrate the importance of candidal–bacterial interactions, focussing on the specific mechanistic interactions between streptococci and staphylococci. Data from integrated OMIC approaches will be used to show the possibilities for the study of complex interkingdom interactions. Collectively, these data will highlight the clinical importance of the mycobiome–microbiome in oral health, and our need to consider them in combination.



Mixed *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* biofilm communities.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

MSC-1 成熟期エナメル芽細胞の形態と機能：オーバービュー

○高野 吉郎

医科歯科大（名誉教授）

エナメル質の形成は単純な添加的石灰化の進行によるのではなく、エナメル質の整然とした内部構造を決定する母床としての基質が合成・分泌される基質形成期と、その基質から有機性成分が分解・脱却され、結晶成長が持続する成熟期の二段階で進行する。基質形成を終えたエナメル芽細胞は細胞内小器官を再構成し、それまでのタンパク合成・分泌型細胞から活発な吸収能と電解質輸送能を備えた成熟期エナメル芽細胞へと変貌する。並行してエナメル器の他の細胞も大きく変化し、多数の小突起と豊富なミトコンドリアを特徴とする細胞集団から成る乳頭層をかたちづくる。乳頭層の細胞間およびそれらとエナメル芽細胞間にはギャップ結合が発達し、エナメル器全域が緊密な情報ネットワークで結ばれた一つの動的ユニットとして機能することを可能にしている。

成熟期エナメル芽細胞は波状縁を持つ状態(RA)と持たない状態(SA)を繰り返す。このためエナメル芽細胞層にはRAとSAの細胞集団による縞状の繰り返しパターンが発現する。縞状パターンは動物種、歯種固有であり、左右歯でほぼ空間対象を示す。この興味深い現象を制御する仕組みは未だ不明であるが、これまでに蓄積された膨大な形態学的、化学的データの解析と近年のtranscriptome解析等の進展によって、イオン輸送、pH制御、基質の分解・脱却に関わるRAとSAの具体的な役割とその分子機構の一端が明らかにされつつある。

ここでは成熟期エナメル芽細胞の形態と機能を概説するとともに、周期的形態変化がエナメル質の結晶成長に果たす役割と影響について、関連データを紹介する。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Structure and function of maturation stage ameloblasts: An overview

○Takano Y

Tokyo Med Dent Univ (Emeritus)

Amelogenesis proceeds in two distinct stages; matrix formation and maturation, in the latter stage organic matrix of enamel is almost totally removed allowing for an extended growth of apatite crystals. After a completion of secretory stage, the ameloblasts transform themselves from protein secretory cells to absorptive/ transporting cells (maturation ameloblasts), and form a functional unit with the other cells of the enamel organ (papillary layer cells), all connected by the well developed gap junctions. Maturation ameloblasts transiently display a ruffled border and return to the state without it and are respectively called RA and SA. Ameloblasts continue reciprocal RA-SA transition throughout the maturation period, and generate alternative bands of cohorts of RA and SA in the maturation ameloblast layer. The banding patterns of RA and SA are species and tooth type specific and spatially symmetrical in the tooth germs of contralateral teeth. Analyses of accumulated data and advancement of recent transcriptome studies have revealed practical roles essential for enamel mineralization played by RA and SA and the underlining molecular mechanisms. Here I introduce my view of structure and function of maturation stage ameloblasts, and present some data relevant to RA-SA effects on enamel crystal growth.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

MSC-2 成熟期エナメル芽細胞と KLK4 の役割

○山越 康雄¹, 小林 冴子²

¹鶴大 歯 分子生化

²鶴大 歯 小児歯

エナメル質形成過程において、エナメルタンパク質は主として2つのプロテアーゼによってプロセシングおよび分解を受けながらエナメル質から消失していく。基質形成期ではマトリックスメタロプロテアーゼであるエナメリシン(MMP20)が合成・分泌され、エナメルタンパク質をゆっくりとプロセシングする。その後、移行期および成熟期になるとセリンプロテアーゼであるカリクレイン4(KLK4)が合成・分泌され、エナメルタンパク質を急速に分解していく。このようにMMP20およびKLK4の役割は主としてエナメルタンパク質の分解と脱却として知られていたが、近年我々はMMP20がKLK4の活性化に関与し、活性化されたKLK4がMMP20の触媒ドメインを切断して不活化することを明らかにした。また我々は幼若エナメル質には生理活性物質であるトランスフォーミング成長因子ベータ1(TGF-β1)が存在することを報告したが、最近の研究において潜在型のTGF-β1遺伝子がエナメル質形成過程における全ステージで発現していることを明らかにし、基質形成期エナメル芽細胞から合成・分泌された潜在型TGF-β1がMMP20によって活性化されることを見出した。さらに活性化されたTGF-β1は主要アメロゲニン、特に水溶性のアメロゲニンと結合することでその活性が維持され、エナメル芽細胞表面に存在する受容体と結合することでシグナル伝達が行われることを明らかにした。そして移行期および成熟期において、KLK4はアメロゲニンの分解の傍らでTGF-β1の分解と失活にも関与することを明らかにした。本シンポジウムでは、KLK4の構造の特徴、エナメルタンパク質に対する作用、MMP-20との相互作用、TGF-β1のオートクリンにおける作用に関するデータを示しながら成熟期エナメル芽細胞とKLK4について討論したいと考えている。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

The role of KLK4 and maturation-stage ameloblasts

○Yamakoshi Y¹, Kobayashi-Kinoshita S²

¹Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

²Dept Pediatr Dent, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

Enamelysin (MMP20) and kallikrein 4 (KLK4) are believed to be necessary to clear proteins from the enamel matrix of developing teeth. MMP20 is expressed by secretory stage ameloblasts, while KLK4 is expressed from the transition stage throughout the maturation stage. Beside the processing and degradation of enamel proteins by MMP20 and KLK4, we also have demonstrated that MMP20 activates proKLK4 and KLK4 inactivates MMP20 *in vitro*. Moreover, our previous study has revealed that the transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) is present in porcine enamel extracts. Our recent works have demonstrated that (1) the mRNA of latent TGF-β1 is expressed throughout the amelogenesis, (2) latent TGF-β1 is activated by MMP20 coinciding with the processing of amelogenins by the same proteinase, (3) activated TGF-β1 binds to major amelogenin cleavage products, particularly the water-soluble amelogenin, to maintain its activity, (4) the water-soluble amelogenin-TGF-β1 complex binds to the TGF-β receptor to induce TGF-β1 signaling, (5) the water-soluble amelogenin-TGF-β1 complex is slowly cleaved by KLK4, and (6) TGF-β1 activity is reduced. Showing those data, we would like to discuss more about KLK4 during enamel formation in this symposium.

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

MSC-3 エナメル質石灰化に関わる TRP チャンネルの発現と機能

○岡部 幸司¹, 緒方佳代子^{1,2}, 進 正史¹, 岡本富士雄¹, 岡 暁子², 鍛冶屋 浩¹

¹福歯大 細胞生理

²福歯大 成育小児歯

歯の石灰化の分子機構に関しては未だ不明なことが多い。我々は、Ca²⁺やMg²⁺等のミネラル輸送を担う陽イオンチャンネルでありながら、酵素としてのキナーゼドメインを併せ持つユニークな“Channel-kinase” TRPM7に着目し、歯の石灰化における役割について検討を行った。TRPM7の全身欠損マウスは胎生致死であるため、点変異によりキナーゼ機能を欠失したTRPM7キナーゼ変異マウスのin vivo機能解析を行った。この変異マウスは野生型と比較して、体型や健康状態などに差は無かったが、興味あることに切歯が白色化を呈した。歯のマикроCTおよび組織学的解析を行った結果、切歯エナメル質の形成不全が観察され、TRPM7がエナメル質形成に関与する可能性が考えられた。そこで、TRPM7の発現部位をin situ hybridizationおよびreal time PCRを用いてスクリーニングした結果、他の組織に比べ歯において特段に高い発現を認めた。また、TRPM7発現の免疫組織学的な解析により、胎生16.5日齢以降の歯胚の歯乳頭およびエナメル器に発現を認め、さらに発生が進むと、TRPM7はエナメル芽細胞と象牙芽細胞に高い発現を認めた。次に、エナメル芽細胞株SF2及び象牙芽細胞株mDP細胞を用いてin vitroでのTRPM7の発現を検討した結果、両細胞株とも高いTRPM7の発現を認めると共に、パッチクランプ法にてTRPM7様イオン電流が検出された。現在、shRNAを用いたTRPM7ノックダウンによるTRPM7様イオン電流と石灰化との関係、及びエナメル芽細胞特異的なTRPM7コンディショナル欠損マウスの検討を行っている。以上のことから、TRPM7は、エナメル芽細胞および象牙芽細胞に特徴的に発現するチャンネル蛋白であり、エナメル質形成の石灰化過程等で重要な役割を持つことが示唆された。

非会員共同研究者：圓谷智之、片桐千秋、松下正之（琉球大 医 分子・細胞生理）

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Expression and function of TRP channel involved in enamel mineralization

○Okabe K¹, Ogata K^{1,2}, Shin M¹, Oka K², Okamoto F¹, Kajiya H¹

¹Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll

²Pediatr Dent, Fukuoka Dent Coll

Transient receptor potential (TRP) melastatin subfamily member 7 (TRPM7) is a unique bi-functional cation channel containing a protein kinase domain and contributes in mineral metabolism. In the present study, we focused on the role of TRPM7 in tooth mineralization. Since the TRPM7-deficient mice showed embryonic lethality, TRPM7-kinase inactive mutant mice by point mutagenesis of kinase domain was analyzed to study TRPM7 function in vivo and showed the enamel defect with hypomineralization of incisors. TRPM7 mRNA was highly expressed in a tooth compared with the other tissue through experiment with in situ hybridization and real time PCR. The localization of TRPM7 was observed in apical side of odontoblast and ameloblast after bell stage tooth germ. For the functional analysis of TRPM7, ameloblastic (SF-2) and odontoblastic (mDP) cell line were used. Both of SF-2 and mDP cells showed not only higher expression of TRPM7 but also higher activity of TRPM7-like currents. We are investigating a relationship between TRPM7 channel activity and matrix mineralization using TRPM7-knockdown in SF-2 cell and TRPM7 conditional knockout mice at present. TRPM7 is highly expressed in ameloblast and odontoblast during tooth development, closely involved in mineralization of dentin and enamel matrix.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

MSC-4 成熟期エナメル芽細胞での V-ATPase の機能と高度石灰化との関連

○原田 英光¹, 依田 浩子², 佐原 資謹³, 大島 勇人², 藤原 尚樹¹, 大津 圭史¹

¹岩医大 解剖 発生再生

²新潟大 院医歯 硬組織形態

³岩医大 生理 病態生理

エナメル質は、象牙質や骨とは異なりさらに硬度に石灰化した組織であるが、それは基質を分泌して基本構造を構築する形成期エナメル芽細胞とその基質を分解・吸収してアパタイトの結晶成長を制御する成熟期エナメル芽細胞などの分化過程を得ることで成し遂げられる。V-ATPase は、プロトンを輸送して酸性環境を形成するモータータンパクであり、成熟期エナメル芽細胞に発現してエナメル基質表面の酸性化に関わることが知られている。この V-ATPase と石灰化との役割を解明するために、破骨細胞に強く発現することで知られる a3-isoform を中心に発現と機能の解析を行った。a3-GFP 発現マウスや免疫組織学的検索から、破骨細胞ほど強く発現はしていないが、移行期から成熟期のエナメル芽細胞に発現することを確認した。そこで、高密度培養によって成熟期エナメル芽細胞の特徴を示す細胞株 (HAT7: Kawano, S., et al., J Dent Res, 2004, Bori, E., et al., J Dent Res, 2016) を用いて a3-isoform の機能解析を行った。a3-isoform の強発現 HAT7 では、細胞上面では培地の中性を維持する緩衝作用がみられ、一方、基底面では酸性環境が構築されていた。またアパタイトコート培養皿で培養したところ、基底面形態に沿った吸収像が一部に観察された。次に、a3-isoform の遺伝子欠損マウスを解析したところ、切歯と臼歯の形態異常や萌出不全が観察されたが、エナメル芽細胞には特に異常を認めなかった。そこで、上皮特異的な遺伝子欠損マウスを作製したところ、一部が破折したり、白色を呈したエナメル質形成不全を生じた。以上の結果から、a3-isoform はエナメル芽細胞の分化には直接関与はしないものの、プロトンポンプの形成ならびに基底側への局在に重要な働きをしており、エナメル質の高度石灰化に関わる重要な因子の 1 つであると考えられた。

(非会員共同研究者: 松元奈緒美, 中西(松井)真弓 岩手医大 薬 機能生化)

【利益相反】 利益相反状態にありません。

Function of V-ATPase for highly calcification during enamel maturation

○Harada H¹, Ida-Yonemochi H², Sahara Y³, Ohshima H², Fujiwara N¹, Otsu K¹

¹Dept Anat, Iwate Med Univ

²Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch

³Dept Physiol, Iwate Med Univ

Ameloblasts produce the hardest tissue in the body through various differentiation stages, but the mechanisms have not been understood sufficiently. Vacuolar proton-ATPase (V-H⁺ATPase) is a multi-subunit enzyme that regulates proton transport and creates the acidic microenvironment. It has been known that the matured ameloblasts express V-H⁺ATPase and play a role of produce the acidic microenvironment at the surface of enamel matrix. To reveal a role of V-H⁺ATPase during amelogenesis, we examined the expression pattern of a3-isoform, referred to as an osteoclast type, in ameloblast differentiation, and carried out gain and loss function experiments using ameloblast cell line (HAT7). Comparing with the strong expression of osteoclasts, the expression of ameloblasts was very weak. The overexpression of a3-isoform induced acidic microenvironment at the basal side and resorption pits at the apatite coat in culture dish. Further, epithelial specific a3-deficient mice exhibited amelogenesis imperfecta in lower incisors. Taken together, we consider that the acidic microenvironment by matured ameloblasts is closely associated with higher calcification of enamel. In this meeting, we will discuss the role of a3-isoform in matured ameloblasts and differentiation mechanisms from secretory type to matured type, and further consider the mechanisms for high calcification during amelogenesis.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

MSC-5 成熟期エナメル芽細胞の分化制御と糖代謝の役割

○依田 浩子

新潟大 院医歯 硬組織形態

グルコースは細胞代謝に必須のエネルギー源であり、歯胚細胞の増殖および分化調節に糖代謝が重要な役割を果たしている。とくにエナメル芽細胞分化過程においては、グルコース取り込み調節から細胞内グルコースの代謝経路まで厳密に制御されていることが我々の研究で明らかになりつつある。内エナメル上皮細胞、前エナメル芽細胞では glucose transporter (GLUT) を介した受動輸送によりグルコースが細胞内へ取り込まれ、ATP 産生へと代謝されるのに対し、形成期からはグリコーゲン合成・分解を経由する糖代謝経路も加わり、エナメル基質形成に必要なエネルギー産生を行っていることが明らかとなった (Ida-Yonemochi H *et al.*, Dev Biol 2012, Mech Dev 2016)。さらに、現在は成熟期エナメル芽細胞におけるエネルギー代謝に焦点を当てて研究を進めている。成熟期では乳頭層およびエナメル芽細胞層で Ca^{2+} や Na^{+} などのイオン輸送が活発に行われているが、それら細胞内外のイオン勾配を利用したグルコース取り込み調節に関する研究は皆無である。そこで我々は Na^{+} 依存性のグルコース能動輸送に着目し、sodium-dependent glucose transporter (SGLT) の発現様式とその機能的意義について検討した。

成熟期ではグルコース受動輸送を担う GLUT2 の発現とともに、グルコース高親和性の SGLT1 ならびに高容量で低親和性の SGLT2 が乳頭層細胞およびエナメル芽細胞に発現しており、細胞内外の Na^{+} 濃度勾配の調節に重要な $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase と局在領域が一致していた。SGLT1/2 阻害剤を用いた歯胚器官培養でエナメル基質形成と石灰化が抑制されたことより、エナメル質形成ならびに成熟過程において、エナメル芽細胞はグルコースの受動輸送のみならず、細胞内外の Na^{+} 濃度勾配を利用したグルコース能動輸送も同時に行うことにより、エナメル質の形成および成熟過程に必要なエネルギーを確保している可能性が示唆された。本講演では成熟期エナメル芽細胞の糖代謝機構に加えて、糖尿病などの糖代謝異常とエナメル質形成異常についても言及したい。

【利益相反】 利益相反状態にありません。

Role of glucose metabolism in cell differentiation of maturation stage ameloblasts

○Ida-Yonemochi H

Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Glucose is an essential source of energy for cells, and glucose metabolism plays an important role in cell growth and differentiation. Recently, we reported that glucose uptake and its metabolic pathway are strictly regulated during ameloblast differentiation. Glucose is incorporated via passive glucose transporters (GLUTs) and is directly used to produce the ATP in preameloblasts. Hence, glycogen shunt occurs to obtain sufficient energy for enamel formation in secretory ameloblasts (Ida-Yonemochi H *et al.*, Dev Biol 2012, Mech Dev 2016). In the maturation stage, although active ion transport occurs, there are no reports concerning the involvement of ion-dependent glucose transport. Therefore, we analyzed the localization and functional significance of sodium-dependent glucose transporters (SGLTs) in the maturation stage of amelogenesis. SGLT1/2 were immunolocalized in the papillary layer and mature ameloblasts together with GLUT2, and they were colocalized with $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase. The inhibition of SGLT1/2 in organ culture experiments induced the disturbance of enamel matrix formation and calcification. These findings suggest that glucose uptake mediated by active glucose transporters plays a crucial role in enamel maturation. In this symposium, I will summarize the role of glucose metabolism in mature ameloblasts, and discuss the pathogenesis of enamel hypoplasia found in glucose metabolic disorder.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

MSD-1 歯周病，歯牙欠損がアルツハイマー病分子病態ならびに認知機能に及ぼす影響に関する研究

○道川 誠

名古屋市大 院医 病態生化

歯周病ならびに口腔環境悪化とアルツハイマー病および認知症との関連が，複数の疫学研究によって指摘されている．しかしながら，両者の関連を明らかにした基礎研究は不十分であり，両者を結ぶ因果関係の分子基盤は明らかにではない．また，超高齢社会に突入したわが国においては，認知症患者数の増大にともなって認知症に関する知識は歯科診療においても必須となっている．こうした背景を受けて本講演では，アルツハイマー病に代表される認知症について概説するとともに，基礎研究の視点から，口腔疾患・咀嚼機能低下の代表的病態として，歯周病（炎症）ならびに歯の欠損（咀嚼低下）を取り上げ，それらがアルツハイマー病分子病態，脳神経細胞の形態と機能，および記憶・学習機能へ及ぼす影響と，その分子メカニズムについて，動物モデルを用いた私たちの研究成果を中心に紹介する．アルツハイマー病の発症予防や進行抑制，症状緩和に，歯周病の治療や予防・口腔ケアが有効であることが明らかになれば，歯科医療・口腔ケアの果たす医学的・社会的意義は大きい．

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する．

Studies on molecular mechanisms underlying dementia induced by periodontal disease and masticatory dysfunction in mice

○Michikawa M

Dept Biochem, Nagoya City Univ Sch Med Sci

Recent studies have suggested that oral disease such as periodontitis and masticatory dysfunction lead to memory impairment and dementia. There have been reports showing the association between tooth loss and cognitive impairment and dementia in older populations. However, the pathway(s) or mechanism(s) involved are yet to be clarified. A better understanding of these mechanisms would enable interventions to prevent the development and progress of dementia by maintaining oral health or by providing oral rehabilitation, including chewing.

It is known that periodontal disease causes inflammation throughout the body, and that masticatory dysfunction involves disruption of complex coordinated movements, which are performed by perioral motor and sensory functions. Thus, it would be reasonable to postulate the existence of distinct pathways, one linking impaired masticatory function to impaired memory function, and the other linking inflammation due to periodontal disease and oral infections to dementia. The association may be complex and bidirectional, with bad oral health posing as a risk factor for and a consequence of neurodegenerative processes. However, the pathway(s) or mechanism(s) underlying this mouth-to-brain association are not completely understood.

In this symposium, we will review the clinical and epidemiological evidence showing a clear association between oral dysfunction and memory impairment and present basic studies to clarify the underlying mechanism(s).

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

MSD-2 幼若期における食物性状と高次脳機能の変調

○小野 卓史

医科歯科大 院医歯 咬合機能矯正

「よく噛むこと」の効用は巷間言われており、ヒトを対象とした脳機能画像を用いた研究においても、咀嚼が学習・記憶機能に与える影響が示されている。しかしながら、先行研究の多くは、認知症などを想定した成熟個体におけるものであり、若年者を対象としたものは少ない。本講演ではまず、3週齢マウスにおいて食物性状が成長期における高次脳機能に与える影響を知るために、離乳期以降の軟食飼料飼育に伴う咀嚼刺激低下が、記憶・学習機能に重要な役割を果たしている脳由来神経栄養因子である brain-derived neurotrophic factor (BDNF) およびその受容体である tyrosine kinase receptor B (TrkB receptor) に与える影響に着目し、行動学的・組織生化学的に検討した研究を報告する。続いて、同様の実験において、咀嚼筋・下顎骨の形態学的変化、行動学的変化ならびに海馬・大脳皮質の組織学的・機能的変化を解析し、成長期における咀嚼刺激の低下がいかなるメカニズムで脳機能発達に影響を与えるかの解析を試みたので、その研究成果を紹介する。超高齢化社会に入っている我が国において、成人の高次脳機能障害メカニズムの解明は喫緊の課題であるが、それと同時に、病態科学の解明を通じて、若年者の健全な成長発育に關与する生活習慣の改善にも取り組む必要があると考えられる。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Modulation of higher brain function in association with food characteristics during growth period

○Ono T

Orthodont Sci, Tokyo Med Dent Univ

It is well known that mastication is essential for body function, and many human brain imaging studies have reported that mastication has effects on learning and memory function. However, most previous studies have targeted dementia in elderly, not in young generation. In the presentation, I will first report the behavioral and histological study that revealed the liquid diet induced memory impairment accompanied by a signaling dysfunction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase receptor B (TrkB receptor). Second, I will show you the findings with regard to the changes in the masticatory muscles and the craniofacial bone morphology, behaviors and histology and function of the hippocampus and cerebral cortex to investigate the underlying mechanisms. Although the investigation of mechanism of brain dysfunction in adults is obviously a pressing issue, it appears to be necessary to improve the masticatory environment in childhood.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

MSD-3 口腔感覚に関わる末梢-中枢神経間の賦活系および抑制系ネットワーク

○倉本恵梨子, 岩井 治樹, 山中 淳之, 後藤 哲哉

鹿大 院医歯 歯科機能形態

近年, 歯の脱落が認知症の危険因子として報告され, また, 歯の感覚刺激が海馬を活性化し, 認知機能を向上させることが示唆されている. しかしながら, 歯の感覚がどのような神経回路を伝わり, 最終的に海馬の活性化につながるのか詳細は不明である. 歯の触圧覚を受容する一次感覚ニューロンとして, 三叉神経節ニューロンと三叉神経中脳路核ニューロンがある. 中脳路核ニューロンについての逆行性トレーサーを用いた研究では, 中脳路核において大型の偽単極性ニューロンが標識され, 中脳路核の吻内側領域には筋紡錘の, 尾外側領域には歯根膜の感覚ニューロンが局在することが示された. この中脳路核尾外側領域への歯根膜の感覚ニューロンからの投射が海馬の賦活経路に影響を与えているものと推測される.

一方, 活動中は強く感じなかった虫歯の痛みが, 休息中は痛みを強く感じる事がある. これは, 活動中には上位中枢からの制御により脳幹の「内在性の痛覚抑制系」が活性化し, 痛覚入力を抑制するためである. 視床・内側下核 (Sm) 背側部は三叉神経核を介して頭頸部の感覚入力を受け, 活性化して痛覚抑制効果を発揮することが示唆されているが, その基盤となる神経回路は不明である. そこで順行性トレーサーを用いて, Sm から大脳皮質への軸索投射を解析した結果, Sm ニューロンは, 1) 大脳皮質・眼窩野腹外側部に限局して軸索投射する Sm 背側部ニューロン, 2) 眼窩野内側部と外側部の 2 カ所に投射する Sm 腹側部ニューロンの二種類に分類された. 眼窩野腹外側部は中脳水道周囲灰白質への投射を介して痛覚抑制に働くことが示唆されており, Sm-眼窩野腹外側部-中脳水道周囲灰白質経路による痛覚抑制が示唆された. 本シンポジウムでは, 神経回路から考えられる中枢・末梢神経間の賦活系および抑制系について, さらに口腔感覚と情動・記憶・行動とのネットワークについて紹介する.

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する.

Activating and inhibitory system in the peripheral-central neuronal networks of orofacial sensation

○Kuramoto E, Iwai H, Yamanaka A, Goto T

Dept Oral Anat Cell Biol, Grad Sch Med Dent Sci, Kagoshima Univ

Recent studies have shown that mastication improves cognitive functions of hippocampus. Sensory inputs from tooth are transmitted to the mesencephalic trigeminal nucleus (MTN) neurons and trigeminal ganglion neurons, however, the neuronal circuits connecting the sensory neurons and hippocampus is unknown. Using a retrograde-labeling technique, it was revealed that MTN neurons innervating the masticatory muscles and periodontal ligaments were distributed mainly in the rostromedial and caudolateral parts of the MTN, respectively. This result suggests that caudolateral MTN neurons might be related to activation of hippocampus.

We often feel less pain of decayed tooth when we are active than in the rest. The antinociceptive effect is mediated by brainstem pain-modulating pathways, including the periaqueductal gray. Activation of the thalamic nucleus submedius (Sm) can cause antinociception, however, the underlying mechanisms are unknown. Thus, we analyzed thalamocortical projections of single Sm neurons using Sindbis virus. In the cortex, dorsal Sm neurons, which received input from the trigeminal nucleus, sent axons restrictively to the ventrolateral orbital area (VLO), whereas ventral Sm neurons projected to the medial and lateral orbital areas. The dorsal Sm-VLO-periaqueductal gray pathway might modulate pain sensitivity. In this symposium, we will discuss activating and inhibitory neural networks involved in the orofacial sensations.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

MSD-4 ヒトが口腔で認知した味覚は中枢をどのように活性化させているのか： 脳地図から脳機能ネットワークへ

○後藤多津子

東歯大 歯科放射線

味覚は、口に入れる物の安全性を瞬時に判断する本能的価値から、日常の食物の味付け（塩分や糖分量等）、全身疾患、情動、文化との関連もある複雑で重要な総合感覚である。さらに近年、口腔のみならず消化管にも taste receptor が存在することが明らかとなり、ヒトにおいては、味認知の条件の組み合わせが多岐にわたり、未だ健康な成人においてでも基礎的・臨床的なデータがそろっていない。

正常なヒトを傷つけずに脳活動を見るために、これまで、脳機能画像が用いられてきた。中でも脳全体の神経活動を非侵襲的に可視化する functional MRI により、ヒトの味覚に関する脳地図、すなわち口腔から入った味を脳のどの部位で認知しているかが解明されてきた。しかしながら、それらの活動がどのように関連し神経回路を構築しているかは未だ不明点が多い。そこで我々は、舌への味覚刺激が中枢をどのように活性化させているのかを生理学的に解明するための functional MRI システムを構築した。本講演では、軟口蓋、咽頭、消化管の taste receptor を刺激することなく、舌における taste receptor からのみの刺激による味覚の脳地図ならびに脳内ネットワーク研究を紹介する。

多くの神経疾患は脳の機能と構造のネットワークに問題があると言われ、そのメカニズムの解明は最先端の分野である。本研究における正常者データベース構築の試みは、将来的に、患者の主観的意見に左右されない客観的な脳画像を用いた新しい診断における基盤となると考えられる。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

How human brains activate by tastes in the mouths? : From brain mapping to the network

○Goto T

Dept Oral Maxillofac Radiol, Tokyo Dent Coll

Taste is complicated, important, and integrated sense. Taste senses work for our instinctive function that is judging instantly the safety of the material coming into a mouth, seasoning of the daily food (e.g., quantity of salt and sugar), relate to a whole body diseases, emotions, and the cultures. Moreover, it is now revealed that there are taste receptors not only in the oral cavity but also in the gastrointestinal tract. Therefore, there are various combinations of the conditions for tasting, and, we have not had the full array of basic and clinical data for taste perception in humans.

Functional neuroimaging has been used for investing of brain activations non-invasively in healthy humans. Especially, functional magnetic resonance imaging (fMRI) is a technique for measuring brain activity and mapping on a whole brain. However, it is still unknown how those activities build neural network. We developed the novel functional MRI system for the taste stimulation on a tongue to elucidate the activation in the brain. In this symposium, I will introduce brain mapping and network by the stimuli on taste receptors on tongue without stimulating soft palate, pharynx, or gastrointestinal taste receptors.

It is said that many neurological disorders show problem on connectivity of the network in the brain, and the elucidation of such mechanism is one of the highest field of neuroscience. Our trial for constructing the database of healthy subjects could be the base for new objective diagnoses in the future.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

LS-1 硬組織の形態・機能解析のための光学顕微鏡のマルチモードな活用法—微分干渉から先進レーザー顕微鏡の応用例—

○飯村 忠浩^{1~4}, 李 智媛¹

¹愛媛大 プロテオサイエンスセ バイオイメーキング, ²愛媛大 学術支援セ 病態機能解析, ³愛媛大 院医, ⁴愛媛大病院 人工関節セ

高齢化の進行とともに、骨粗鬆症を始めとする骨疾患が増加している。組織学的骨形態計測法は、骨組織切片を観察しさらに数値化することで骨の代謝動態を把握できる優れた解析法である。日本では、1960年代に始まり、それ以来、骨代謝や薬剤導入効果を理解するうえで、臨床医学的にも基礎医学的にも重要な役割を果たしてきた。まさに、定量的イメージング法の先駆けともいえる解析方法である。

私たちの研究室では、従来の骨形態計測法に、様々な光学顕微鏡による観察を統合して、骨代謝を始めとする硬組織の研究を行っている。本シンポジウムでは、組織全体を総覧できるラージ・イメージングから、より微細構造への観察法、いわゆるマルチモードな解析法を紹介する。さらに、高コントラスト微分干渉法、デコンボリューション蛍光観察法、第二次高調波発生などの応用例について紹介したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Multi-modal applications of light microscopy for morphological and functional analyses of hard-tissue —From DIC (differential interference contrast) to innovative fluorescence microcopies—

○Iimura T^{1~4}, Lee J-W²

¹Ehime Univ, Proteo-Science Center (PROS), ²Ehime Univ, Advanced Research Support Center (ADRES), ³Ehime Univ, Grad Sch Med, ⁴Ehime Univ Hosp, Artificial Joint Integrated Center

Population aging accompanies increasing number of patients with bone and skeletal diseases such as osteoporosis. Histological bone morphometry has been an excellent analysis approach which enables us to figure out the metabolic dynamics by directly observing bone tissue section and by quantifying the data. This method has been developed in 1960s in Japan, and it has contributed to patho-physiological understandings, diagnosis and prognosis of bone metabolic diseases since then. Therefore, this analytical method can be recognized as the pioneer of the quantitative imaging method.

Our research group has been applying an integrative approaches of the conventional histological bonemorphometry and several optical microscope imaging techniques. In this symposium, I will introduce “multi-modal” imaging for bone analyses, which includes the correlative imaging from the large imaging for overviewing the entire tissue and down to the micro structure imaging, high contrast DIC, deconvolution fluorescence imaging, super-resolution imaging and second harmonic generation imaging and so on.

Conflict of Interest: None

LS-2 若手研究者のための Author Workshop：学術論文作成に必要な出版倫理と画像処理について（エルゼビア社主催）

○大島 勇人^{1,2}

¹新潟大 院医歯 硬組織形態

²J Oral Biosci 誌編集委員長

研究はその成果としての論文や本の出版を伴う。言い換えれば、研究者は論文や本の出版を通して社会に研究成果を還元する義務を負っている。したがって、論文執筆作業は研究者にとって極めて重要な社会的な活動であると言える。研究者は物事を明らかにしようとするときに仮説を提唱し、その仮説を検証していく。先人たちの研究結果や自分の実験により得られた結果をベースに、いかに論理的に仮説を構築して、それを検証していくかが重要になる。それには、徹底した情報取得と得られた情報の信頼性の評価が「科学的方法」の活用の必要条件となる。また、「仮説」と「実験」との間には密接な相互関係があり、実験的に立証不可能な仮説は空想であるといえる（Paul K Nakane 2014）。

本講演では、若手研究者を対象に、出版倫理に関わる偽造（研究データの捏造）、改ざん（研究データの意図的な操作）、剽窃（他者の研究を盗用すること）、利益相反、オーサーシップ、同時投稿・二重／複数出版、サラム法の問題点について、そして得られた情報の信頼性の評価の鍵を握る画像処理技法について解説することにより、目的と範囲、論文の種類、読者層などがジャーナルに適していること、出版倫理を遵守していること、投稿規定に従うことなどの学術論文作成に必要な心得（良い原稿と悪い原稿の分かれ目）について言及したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Author workshop for young researchers supported by Elsevier: How to make a scientific paper including publishing ethics and image processing

○Ohshima H^{1,2}

¹Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

²EIC of J Oral Biosci

Research urges researchers to publish papers and books. In other words, researchers is obliged to contribute their research outcomes back to the general public with the publication of papers and books. Thus, making a scientific paper is a quite important social activity for researchers. For the clarification of some concerns, researchers aim to propose a hypothesis and verify whether this hypothesis is right or not. To achieve this purpose, it is essential to create a logical hypothesis based on the findings obtained from the previous studies and how the researchers verify the hypothesis is a key step in their success. The thorough information acquisition and the evaluation of information reliability are prerequisite steps for the application of scientific strategy. In this lecture, I focus on the publishing ethics and image processing tips. Finally, I would give a talk about some knowledge of making a scientific paper.

Conflict of Interest: The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

LS-3-1 味覚の新知見（うま味と塩味）

○重村 憲徳^{1,2}

¹九大 院歯 口腔機能解析, ²九大 味覚嗅覚センサ研究開発セ

味覚は、外界から栄養物質を検知・摂取する上で欠かせない感覚である。近年、5基本味（甘味、塩味、苦味、酸味、うま味）が、それぞれ特異的な味覚受容体により引き起こされ、また、その味覚感受性が遺伝子変異により変化することや、液性因子により修飾されることも明らかになってきた。例えば、GPCRであるT1R1+T1R3ヘテロ二量体は、うま味受容体として機能しており、ヒトにおいてはその一塩基多型性（SNPs）により味覚認知閾値が変化する。また、脳や腎臓に作用して体内ナトリウムの維持に重要な役割を担っているアンジオテンシンIIは末梢の味覚器にもその受容体（AT1）を介して作用し、 α ENaC（アミロライド感受性塩味受容体）発現塩味細胞とT1r3発現甘味細胞の味覚感受性を修飾することが明らかとなった。さらに近年、味覚システムが口腔のみならず小腸、膵臓や脳など様々な臓器で発現し、異なる機能を連携させることで効率的な栄養素代謝を可能にしていることが明らかになってきた。これらのことから、味覚システムの基本原理を理解することは摂食とその代謝機構が関連する生活習慣病（糖尿病、高血圧など）に対する新たな予防・治療法の開発に繋がるものと期待される。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

New insights into the taste reception (umami and salty)

○Shigemura N^{1,2}

¹Sect Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ, ²Res Dev Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu Univ

The sense of taste is important for evaluating the quality of food components. Recent studies have revealed that taste sensitivities are defined by distinct taste receptors for five basic taste qualities, such as sweet, bitter, salty, sour and umami. The taste sensitivities are influenced by genetic variations in the taste receptors, and modulated by some endogenous humoral factors. For examples, GPCR T1R1+T1R3 heterodimer functions as an umami taste receptor in mice and humans. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) with amino acid substitutions in T1R1 or T1R3 affect taste recognition threshold for umami substances in humans. Angiotensin II (AngII), which plays important roles in regulating sodium homeostasis in various organs including brain and kidney, modulates both salty and sweet taste sensitivities by acting on AT1 (AngII type 1 receptor) co-expressed with α ENaC (an amiloride-sensitive salt taste receptor) or T1r3 in mouse taste cells. Such variability in taste sensitivity may directly influence ingestive behavior. Furthermore, taste receptors express not only in the oral cavity but also in the gut enteroendocrine cells, pancreatic beta cells and hypothalamic neurons, suggesting functional interactions via taste receptors among these organs may contribute to regulate nutrient homeostasis. Thus, understanding basic principles about taste systems may lead us to design novel strategies to prevent of diet-related diseases such as diabetes or hypertension.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

LS-3-2 歯科医療による高齢者“うま味”感受性維持の重要性

○佐藤しづ子, 庄司 憲明, 笹野 高嗣

東北大 院歯 口腔病態外科 口腔診断

“うま味”感受性低下は、高齢者の低栄養と深く関連する。現在、世界中で高齢化が進行している。壮年期までの医療では、糖尿病、メタボリックシンドロームなど過栄養が関わる疾患が多いが、高齢期では、低栄養が健康障害のリスクとなる。高齢者の低栄養は、筋力低下や臓器機能の衰退、さらに生活自立度を損ない要介護を招く危険因子である。近年、高齢者の低栄養は、経済および社会を圧迫する高齢化社会の重要問題となっている。

味覚外来では、「食べ物の美味しさがなくなり、食欲がなく痩せた」という高齢者味覚障害患者を多く経験する。我々は、Monosodium glutamateを用いた、“うま味”臨床検査法を開発した(PLOS ONE. Doi: 10.1371/journal.pone.0095177, 2014)。臨床応用によって、高齢者味覚障害患者の16%に、“うま味”のみの味覚障害の存在が判明した。これらの患者全員に、食欲低下と体重減少による体調不良が併発していたが、治療後、“うま味”感受性の回復に伴い、食欲ならびに体重が戻り全身状態が改善した。その中には、車イスから自立歩行が可能になった患者もみられた。

さらに、味覚障害と栄養の関連を明らかにするために、高齢者味覚障害患者を対象に、簡易栄養状態評価表、食事摂取頻度調査FFQgを用いた栄養調査を行った。調査結果分析によって、患者の約8割に栄養障害を認め、多くの患者に摂取食品のアンバランスがみられた。その傾向は、“うま味”感受性低下者で著しかった。

“うま味”感受性低下は、単なる感覚障害にとどまらず、栄養障害を生じて高齢者の全身健康状態を悪化させる。高齢化社会において、味覚障害治療による“うま味”感受性維持は、健康長寿を実現する重要な鍵として歯科医療に求められている。

【利益相反】 著者ならびに共著者は、利益相反がないことを宣言します。

Importance of umami taste sensitivity maintenance on elderly's health with dentistry

○Satoh-Kuriwada S, Shoji N, Sasano T

Div Oral Diagnosis, Tohoku Univ Grad Sch Dent

The decline of umami taste sensation is related to malnutrition, particularly in the elderly people. The aging of population is rapidly advancing in the world. In aging society, malnutrition in the elderly causes the economic and social problems. Patients with taste disorders often complain about the low palatability of food. However, there is no clinical assessment for umami taste sensitivity. We have developed a clinical test for umami-taste sensitivity using a filter paper disc with a range of six monosodium glutamate (MSG) concentrations. In clinical practice, 16 percent of the patients showed higher recognition threshold (RT) only for the umami-taste, whereas the other four basic tastes' (sweet, salty, sour and bitter) RT were all within normal levels. These patients were all elderly, and complained of appetite and weight loss and poor health. After treatment, their umami taste threshold recovered, and they regained appetite, weight and good health. Furthermore, we investigated how the nutrient intake is in elderly patients with taste disorder. As the results, malnutrition and its' risk, moreover inadequate meal were observed in over 80 % of the patients. Maintenance of umami taste sensation is important to the good health for the elderly.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS1-1 歯科インプラントはどこまで患者を満足させてきたか

○古澤 利武¹, 久保木芳徳²

¹山形大 院理工, 古澤歯科医院

²北大 院地球環境科学

現在の高齢社会と共に歯周病罹患率は高くなり、それによる歯牙欠損数は増えていく傾向にある。歯牙欠損後の補綴物に可撤性義歯がある。現代の歯科医療の到達目標は顎、口腔システムの萎縮、病気になるいは外傷に対して、正常な形態、機能、快適さ、審美性、発音の回復、健康を維持することである。しかしながら、患者がより多くの歯を喪失すればするほど、従来の歯科医療ではこの目標達成が難しくなるため義歯による補綴治療が行われているのが現状である。義歯を装着した患者の多くは、良く噛めない、義歯が落ちてくる、義歯が浮く、うまくしゃべれないなど義歯に対する違和感を訴える患者が多い。そこで、骨内に維持を求めるインプラント補綴処置が患者のQOL向上に役にたっていると考え。たとえば、上下無歯顎、総義歯の患者においては、上顎、下顎に数本のインプラント埋入を行った後、インプラントと床によるオーバードンチャーは、上顎においては、無口蓋義歯にできる。上顎を無口蓋にする事により劇的に発音の改善、味覚の回復が期待できる。下顎の場合でもほとんど義歯を動くことが無くなる事ができ安心して食事を取ることができる。このように歯科インプラント治療は、一本の歯牙欠損から無歯顎患者に対してまで満足感を得ることができると考える。今回、演者らは、15年以上経過している長期症例について患者の満足感を考察し報告する。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言します。

How much has implant dentistry satisfied patients?

○Furusawa T¹, Kuboki Y²

¹Grad Sch Sci Engin, Yamagata Univ/ Furusawa Dental Clinic

²Fac Earth Environ Sci, Hokkaido Univ

As we enjoy the increase in longevity, the chance of the dental loss also increases. Long ago, it was a common practice to use dentures. Recent years, dentists have pursued more complete recovery of dental functions as well as the recovery of sensuousness, comfort, pronunciation, and health of the body as a whole. In reality, however, too much loss of teeth makes it difficult to fully recover the functions; therefore dentures are still used in many cases. On the other hand, dentures are associated with the following problems: unsatisfactory mastication, loose fitting, and unclear utterance. The most highly recommended option is oral implantation, which are supported by alveolar bones. Oral implantation has been proved to enhance QOL of the patients. The techniques of oral implantation have also been improved. For example, it is now possible to use palatumless dentures on the upper jaw after placing a few oral implants, which largely help pronunciation and gustatory sense. The same is true on the lower jaw and the patients can fully enjoy food and conversation. Implant dentistry can satisfy a large variety of patients: from single tooth loss to complete loss. I am to report the outcome of dental implantation in terms of the contribution to the patients' satisfaction from the cases that have passed more than 15 years.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS1-2 インプラント歯頸部閉鎖の問題の新しい解決法 ～歯肉統合～

○八上 公利¹, 定岡 直¹, 久保木芳徳², 古澤 利武³, 飴谷 彰洋⁴

¹松歯大 院 健康増進口腔科学

²北大 院 地球環境科学

³山形大 工

⁴ハイレックスコーポレーション

口腔インプラントは、人類が古来から咀嚼機能を維持する治療法として確立した非常に有効な方法であり、その治療の成功率は97%にも達する。国内においても人口の高齢化と義歯に代わる新しい選択肢として、今後QOLの向上を求めて50%以上の増加が予想されている。しかしながら、天然歯と同様に口腔衛生状態の不良や生活習慣病による周囲組織の炎症や感染によりインプラント周囲炎を発症し、予後不良となる要因として最も多い。その原因は、天然歯の様な生物学的付着および歯周靭帯がインプラント体との接触面に形成されなないため、インプラント周囲ポケット内に繁殖した細菌により直接骨吸収が進行することにある。この周囲炎の予防は、現在のところ日常的な機械的清掃法によるインプラントと周囲ポケットに停滞した細菌の除去である。しかしながら、天然歯に比べてポケットが深いインプラント特有の形態により、患者個人による管理では十分な効果が得られないのが現状である。また一方で、インプラント治療の今日の世界における一般的な要求は、補綴による機能回復のみならず、審美的な軟組織プロフィールである。Brånemark システムの開発以来、審美的な要求は長年にわたって考慮に入れられなかった。しかし、1990年代になり前歯部のインプラント周囲への審美性が考慮されるようになった。したがって、インプラントと周囲歯肉における構造的な統合（Gingival integration）の達成が要求されている。これらの問題を解決するために我々はチタン繊維を用いて、生物学的付着や歯周靭帯に代わる構造をインプラントに付与することを検討し、in vitro および in vivo の研究を行ってきたのでその概要を報告する。

【利益相反】 ハイレックス社より実験に使用したTW 繊維体の無償提供を得ている。

New solution to oral implant for gingival integration

○Yagami K¹, Sadaoka S¹, Kuboki Y², Furusawa T³, Ametani A⁴

¹Dept Stomatol for Health Promotion, Grad Sch, Matsumoto Dent Univ

²Fac Earth Environ Sci, Hokkaido Univ

³Grad Sch Sci Engin, Yamagata Univ

⁴HI-LEX Corp

The oral implant is a very beneficial method established as the therapy that the human restores a mastication function from ancient times, and the therapeutic success rate reaches 97%. Increase of more than 50% is expected for the aging of the population and improvement of the quality of life as a new choice for denture or bridge in future in this country. However, peri-implantitis develops by inflammation and the infection of the surrounding tissue due to defectiveness and life-style related diseases of the form of oral hygiene similar to natural teeth and is most common as the factor that comes to have a poor prognosis. Because the biological adhesion such as natural teeth and periodontal ligament are not formed to the contact surface with the implant body as for the cause, it is to progress direct resorption of bone by the bacteria which spread in implant periphery pocket. Prevention of the peri-implantitis is the bacterial ablation that adhered to implant and the periphery pocket by the daily mechanical cleaning method currently. However, in the form of characteristic of the implant, enough effects are not obtained by the management by the patient that a pocket is deeper than natural teeth. On the other hand, the common demand in today's world of the treatment with

implant is not only the function recovery by prosthesis but also a cosmetic soft tissue profile. Since the development of Brånemark system, the cosmetic demand was not taken into account for many years. However, a cosmetic problem to the implant periphery of the front tooth part came to be considered in the 1990s. Therefore, the achievement of the structural integration (Gingival integration) in implant and the periphery gingiva is required. We considered whether giving the structure for the biological adhesion and periodontal ligament to implant using titanium fiber to solve these problems, and we report in vitro and in vivo results.

Conflict of Interest: We obtained a gratuitous offer with the TW fiber samples for this experiment from HI-LEX Corporation.

SS1-3 新素材 CNTs のチタン表面処理への応用

○横山 敦郎

北大 院歯 口腔機能補綴

カーボンナノチューブ (CNTs) は、炭素原子のみから構成される新素材であり、基礎研究とともに様々な材料・製品へ応用が進められているが、医学領域への応用、特に生体材料への応用に関する研究は、漸く端緒についたばかりである。我々は、CNTs の生体材料への応用を目的に基礎研究を行い、細胞毒性が低く、起炎性が低いこと、骨芽細胞が強固に付着するといった CNTs の生物学的特性を明らかにするとともに CNTs を用いた骨芽細胞培養用スキャホールドの開発や GBR 膜への応用などについて報告を行ってきた。本発表においては、チタンに対する表面処理としての多層カーボンナノチューブ (MWCNTs) とカーボンナノホーン (CNHs) の応用について報告する。MWCNTs については、シランカップリング処理した陽極酸化チタンを MWCNTs 分散液に浸漬することにより、また、CNHs については、CNHs 分散液中での泳動電着により陽極酸化チタンに表面処理を行った。表面処理を行った試料については、細胞培養特性を検討するとともに、骨組織との適合性を動物実験にて評価した。陽極酸化チタン表面に MWCNTs, CNHs を均一にコーティングすることが可能であった。骨芽細胞は、MWCNTs および CNHs で表面処理した試料上で伸展し、増殖は対照群とした陽極酸化チタンに比較し有意に優れていた。大腿骨内埋入試験においても、対照群に比較し優れた結果を示した。また、MWCNTs は、埋入 4 週間においても陽極酸化チタン表面に観察された。以上の結果から、新素材である CNTs は、生体材料を目的としたチタンに対する表面処理方法として有効であることが示された。

【利益相反】 本発表について著者は利益相反がないことを宣言します。

Application of CNTs to the surface treatment of titanium

○Yokoyama A

Dept Oral Funct Prosthodont Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Carbon nanotubes (CNTs) are new materials composed of carbon atoms and have attracted a great deal of attention with their unique properties. We have been carrying out basic studying about CNTs in order to apply them as biomaterials and reported that CNTs have excellent biological properties such as low cytotoxicity and strong cell adhesion, and also suggested application for the scaffolds for osteoblasts and GBR membrane. The purpose of this study is to coat multi-walled CNTs (MWCNTs) and Carbon nanohorns (CNHs) on anodized titanium, and to evaluate the effects on osteoblasts and bone tissue. MWCNTs and CNHs could be coated homogeneously on the anodized Ti. Osteoblasts on Ti treated MWCNTs (MWCNT-Ti) and CNHs (CNHs-Ti) showed excellent proliferation. Histological investigations revealed that bone tissue attached to the surface of MWCNTs-Ti and CNHs-Ti directly. Thus the surface modification of anodized Ti by CNTs could be effective for biomaterials.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS1-4 アパタイトによるチタン表面処理の効用とその限界

○越智 守生, 仲西 康裕, 廣瀬由紀人

北医療大 歯 インプラント補綴

ハイドロキシアパタイト (HA) コーティング処理をしたチタンインプラントは高い骨伝導能によりバイオインテグレーション (オッセオインテグレーション) を獲得し治癒期間の短縮による咀嚼機能の早期回復や, 歯槽骨が不足した症例, 骨質が不良な症例においてもその骨伝導能により口腔インプラント治療を可能としてきた. そこで我々のグループは各種アパタイトによるチタン表面処理による研究成果を報告してきた.

家兎インプラント埋入実験において, HA 顆粒をチタン表面にブラスト加工することにより機械加工や酸処理の表面性状と比較して有意にインプラント回転除去トルク値 (RTV) およびインプラント-骨接触率 (BIC) を確認した. 熱分解法による HA コーティング処理を施したチタンインプラントで同様の実験を行った結果ブラスト処理の表面性状と比較して RTV, BIC は有意に上昇した.

HA コーティング処理の限界を検討するためにインプラント周囲に骨間隙を与えた実験モデルにおいて, 通常よりも 1.0 mm 過大なインプラント床形成したものに熱分解法 HA コーティングインプラントを使用することで適正なインプラント床形成をしたブラスト処理のインプラントと同等の RTV を示した. このことによりインプラント周囲にある程度の骨間隙が存在しても十分な骨固着力が得ることが示唆された.

HA コーティング処理は剥離の危険性が報告されておりその問題を解決するためスパッタリング法による HA コーティングインプラントを 2004 年より北医療大, 東京医歯大の 2 施設で臨床試験を実施した. 現在 10 年経過した症例がある. この臨床試験を通じてアパタイトによるインプラント表面処理の有用性が示された. しかしアパタイトを過信しすぎることなく適切な術前診断, 外科手術および補綴設計がインプラント治療では重要である.

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する.

The efficacy and limitation of hydroxyapatite coated implants

○Ochi M, Nakanishi Y, Hirose Y

Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent Div Fixed Prosthodont Oral Implantol

Titanium implants coated with hydroxyapatite (HA) has a high biological compatibility and osteoconduction. Therefore, HA-coated implants are used in order to shorten the period of osseointegration on dental implant therapy. We reported that surface treatment with HA on titanium implant by animal experiments showed significantly high biomechanical strength and bone-implant ratio. The study of HA surface properties performed 1.0 mm larger implant socket placed HA coated implant by thermal decomposition method. The results showed equal biomechanical strength to normal implant socket placed sand-blasted implant.

We conducted a clinical trial thin HA layer coated implant by sputtering method, showed good clinical result.

It is important for dental implant therapy that appropriate preoperative diagnosis, surgical ability and prosthetic design without great efficacy expectation of HA properties.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS1-5 象牙質マテリアルと骨誘導外科の融合による骨再生

○村田 勝¹, 赤澤 敏之²

¹北医療大 顎顔面口腔外科

²北海道立総合研究機構 産業技術研究本部 工業試験場

21世紀はバイオマテリアルを利用して、最小限の侵襲で組織を誘導再生する時代である。ドクターはマテリアルに対する知識を高め、加速した骨肉芽形成を起こすために顎骨や移植骨/象牙質ブロックに生物学的処置（穿孔、脱灰、超音波）を加えるべきである。この処置により、顎骨や移植骨は表面積の増加した活性型構造となり、血管新生と骨再生関連因子（特にBMP）リリースが加速する。すなわち、生物学的処置により活発な骨誘導が進行する感染抵抗性の局所環境となる。

<骨誘導外科の重要ポイント>

1. 細胞・血管侵入を妨げる非吸収性遮断膜を使用しない
2. 母骨と移植骨/象牙質ブロックに穿孔を加えて3次元活性型構造に変える
3. 多孔質連通孔・親水性・生体成分類似マテリアルを使用する

1970年ラット脱灰象牙質の骨誘導現象を Huggins 博士（1966年ノーベル賞受賞）と Urist 博士（BMP 発見）が公表した（Science, 167:896-8）。本論文は最上級ながら歯科医師教育に届いていない。象牙質と骨の成分は極めて類似しており、生活歯由来の脱灰象牙質（無細胞基質）とは BMP などの成長因子を含む酸不溶性コラーゲンである。

2002年膨大な基礎研究を背景に私達は「自家脱灰象牙質による上顎洞挙上術」を世界に先駆けて実施した（北海道医療大学臨床研究）。2007年経産省事業「歯のバイオリサイクル医療システムの開発」を北海道の産学官連携で達成し、その成果は東南アジアから世界に向けて発信した。

2015年7歳の男児。顎裂部骨再生を目的に乳歯由来象牙質即時移植が北大病院（臨床研究）で実施された。乳歯3本から調整した脱灰象牙質顆粒を自家移植して、骨採取が不要であった。

患者自身の不要な歯から調製される脱灰象牙質（DDM）は、弾力や吸収性、形状を治療目的に応じてコントロールできる利点があり、垂直的骨増生にもシンプルに応用可能である。北海道発「歯の成分移植」で歯の価値観と口腔の健康観を向上させ、新技術を世界の患者に届けたい。

<文献>

・ M. Murata, T. Akazawa, M. Mitsugi, I-W. Um, K-W. Kim, Y-K. Kim.

Human Dentin as Novel Biomaterial for Bone Regeneration, Biomaterials, INTECK, Croatia, pp127-140, 2011

・ M. Murata, T. Akazawa, M. Mitsugi, A. Kabir, Y. Minamida, I-W. Um, K-W. Kim, Y-K. Kim, Y. Sun, C-L. Qin.

Autograft of Dentin Materials for Bone Regeneration, Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications, INTECK, Croatia, pp391-403, 2013

・ Advances in Oral Tissue Engineering. Ed. Masaru Murata and In-Woong Um, Quintessence, Chicago, pp1-72, 2014

【利益相反】開示すべき COI なし

Fusion of dentin materials and bone inductive surgery for bone regeneration

○Murata M¹, Akazawa T²

¹Oral and Maxillofac Surg, Health Sci Univ Hokkaido

²Industrial Technology Research, Hokkaido Research Organization

Doctors in 21st century must learn much more about biomaterials for patients. Biological managements

(perforation, demineralization, ultrasonication) should be added to the original cortical bone and the graft materials such as bone/dentin blocks for accelerating the induction of bony granulation tissue. Bone-related growth factors in matrix (mainly BMPs) will release quickly from the biologically treated bone/dentin blocks with the wider surface area, and neovascularization occur actively from the surrounding tissues.

< **Key points for bone inductive surgery** >

1. **Never use non-absorbable, occlusive membranes**
2. **Add perforations to both original bone and graft bone/dentin blocks**
3. **Use body-derived component materials with interconnected porous structure and hydrophilicity**

Dr. CB Huggins (Nobel Prize winner, 1966) and Dr. MR Urist (BMP discoverer) published bone induction by fresh dentin in 1970 (Science, 167:896-8). Unfortunately, most doctors don't know the important report until now. Dentin and bone are almost similar in chemical components. Vital tooth-derived demineralized dentin matrix (DDM) and DBM are defined as acid-insoluble collagen with growth factors. Based on basic science, our pioneering clinical case of DDM autograft was achieved for sinus lifting first in the world, 2002. Moreover, our newly developed mill enabled an immediate autograft in 2007. Milk teeth-derived DDM were grafted into the alveolar cleft of 7 year-old boy in Hokkaido University Hospital, 2015.

The absorbability, elasticity and shape of patient-own DDM can be controlled by the unique treatments. Vertical bone augmentation could be achieved successfully and simply by using a ring-type DDM.

< **References** >

- M. Murata, T. Akazawa, M. Mitsugi, I-W. Um, K-W. Kim, Y-K. Kim.
Human Dentin as Novel Biomaterial for Bone Regeneration, Biomaterials, INTECK, Croatia, pp127-140, 2011
- M. Murata, T. Akazawa, M. Mitsugi, A. Kabir, Y. Minamida, I-W. Um, K-W. Kim, Y-K. Kim, Y. Sun, C-L. Qin.
Autograft of Dentin Materials for Bone Regeneration, Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications, INTECK, Croatia, pp391-403, 2013
- Advances in Oral Tissue Engineering. Ed. Masaru Murata and In-Woong Um, Quintessence, Chicago, pp1-72, 2014

Conflict of Interest: Authors declare no COI.

SS1-6 自己血液由来の PRP 応用と骨代謝マーカーによる硬組織・軟組織、両者の再生

○奥寺 元

東京形成歯科研究会

近年、歯科臨床はインプラントの導入によって大きく変革の時期を迎えている。この変革において重要な点は、患者と医療人共に、従来型の歯科診療になかった新天地と効果を期待しているからである。それは単なる異物感がないとか、よく噛めるものであるとかと言う事だけでない。この変革の本質は、元来、「体の外の処置」を旨としていた歯科医療が、「体の中での操作」に突入したという事実である。すなわち、現在インプラントを周囲組織の回復を再生医療が言われている。

しかし実際は、インプラント体を含めて、「Scaffold」であることを忘れてはならない。この Scaffold の機能が発揮されると、骨再生や周辺組織の改善・維持を通して、生体を修復改善させるという意義がある。しかし、そのためには Scaffold だけではなく、5 大要素、すなわち ①細胞、② Scaffold、③生理活性物質（サイトカイン）、④栄養供給、そして⑤機械的刺激（久保木ら 1989 年）を考慮せねばならない。そのような意義を忘れた、各種素材や手法の改善だけでは、真の骨再生は望めないのではないだろうか？はたまた、インプラントの長期保全を阻害する真の原因も、考察、実証されていないのが現状ではないだろうか？

そこで未だ発展途上にある各種インプラント臨床は、基礎分野とコラボレーションをしながら、現状打開をしなければ信頼される歯科臨床は構築されない。私共、公益法人日本口腔インプラント学会認定施設一般社団法人東京形成歯科研究会は、現在未解決の基礎分野の問題も取り入れながら、臨床に向かっている。その中で、私たちは、硬組織と軟組織の両方の再生に役立つ、自己血液由来の PRP の応用と取り組み、新しい骨補填材や骨代謝マーカーおよび骨規定マーカーを分析し、より「生体に即したインプラント」を目指しているのです。その一端を発表したい。

【利益相反】 利益相反がないこと宣言します。

Application of autologous platelet rich plasma (PRP) for hard and soft tissues reconstruction around the dental implants

○Okudera H

Tokyo Dental Plastic Society

Today, the situation of dental implant is advancing into a new phase, where both patients and dentists begin expecting additional functions for this technology. Indeed, dental implants have recovered a normal mastication and overcome a foreign-body sensation that was common in the conventional dentures. But more than these advancements in dental implant, dentist began to understand that dental implant is an adventure into “the treatment of inside the human body” from “the treatment of outside human body” which conventional dentistry have been mainly engaged.

We should not forget that the root of dental implant is a so-called “scaffold” in regenerative medicine. When the function of this scaffold is rightly exerted, it will increase and maintain alveolar bone and the surrounding tissue, eventually improve the whole living body. However, if the dentist implant really become successful technology, we must consider not only scaffold but also, the four other factors involved: namely (1) cells, (2) scaffolds (natural and artificial extracellular matrix), (3) regulators in general, most typically cytokines, (3) supply of nutrients (vasculatures), and (5) the mechano-dynamic stimuli (Kuboki et al. 1989). If we forget the balanced considerations of these five factors, even the various improvement of materials and techniques would not be expected true bone regeneration.

Implant technology is still developing, while the modern science of regenerative medicine also is developing rapidly in both basic and clinical aspects. What we need is the collaboration between the basic dental scientists and dentist who really practice dental implants. This author, a founder of Tokyo Dental Plastic Society and a member of Japanese Society of Oral Implantology will present the results of regeneration in both hard and soft tissues by application of autologous PRP. In addition, recent results of application of “bone metabolic markers” in order to prospect the outcomes of successful and not-so successful cases of dental implant operations.

Conflict of Interest: Author declares no conflict of interest

SS1-7 チタンの骨内定着の生化学メカニズム解明・インプラント蛋白の意義と応用

○久保木芳徳¹, 古澤 利武², 八上 公利³

¹北大 院地球環境科学

²山形大 院理工

³松歯大 社会歯科

多くの長所にも関わらず、現在、歯科インプラントの4大欠点として、①長い定着時間、②コスト高、③歯根膜の無視、④インプラント歯周炎があげられる。これらの根本的解決は歯科臨床家と基礎科学者の密接な協力にゆだねられている。

主な研究遅滞の原因は60年前に偶然発見された「生きた骨と金属チタンとの強固な結合」(以下、「Ti-bone 結合」と略す)という驚くべき現象の生化学メカニズム(なぜ結合するか)の追究が足りないためと考えられる。このため「Ti-bone 結合」は「60年の謎」として残っていた。54年間、骨の研究に従事してきた私たち生化学研究者は最近の発見に基づいて次のように考えている。「Ti-bone 結合」は異物に対する癒着現象の一種である。必要なことは、この現象をオッセオインテグレーション Osseointegration の名の下に神格化せずに、その聖域を科学的に解明することである。そこで、私たちはこれまで殆ど着手されていなかった「分子のレベル」まで遡り、金属チタンが骨に埋植された時、最初に出会う蛋白分子は何かの問題に絞った。

固体と蛋白との結合を調べる最も有力な方法はクロマトグラフィーである。この方法の発明者がアルミナ粉末を用いたことを習って、チタン・ビーズをクロマトグラフィー・カラムに充填して各種の蛋白を系統的に調べた結果、アルブミン、リゾチームなど多くの蛋白は結合しないことが分かった。

一方で、卵黄ホスビチンと牛乳カゼイン、次いで、骨に存在しRGD配列をもって骨芽細胞を呼び寄せる重要な4種のリンタンパク質(SIBLING蛋白)がチタンに結合することを見出した。SIBLING蛋白を微細繊維チタン・デバイス(Zellez, Hi-Lex, Japan)にコートしてラットの頭蓋骨に埋植したところ、チタン周囲の1週後の骨形成量は対照の100倍以上に増加した。これらの結果から私たちはSIBLING蛋白を「インプラント蛋白」と呼び、新しい生化学的メカニズムを提唱し、実用化を急いでいる。最近になって、骨の最大量蛋白である骨コラーゲンの特定構造もTi-bone結合に関与する知見を得た。詳細を紹介し諸賢のご高見を仰ぎたい。

文献: Kuboki et al.: Bio-Med Mat Eng 22 (2012) 283-28 and 24 (2014) 1539-15

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言します。

Elucidation of the mechanism for the titanium-fixation in living bone: discovery of the implant proteins and its clinical application

○Kuboki Y¹, Furusawa T², Yagami K³

¹Fac Earth Environ Sci, Hokkaido Univ

²Grad Sch Sci Engin Yamagata Univ

³Dept Social Dent Matsumoto Dent Univ

In spite of numerous advantages of dental implants, present situation of this technology still has four shortcomings. They are: (1) a long time for fixation, (2) high cost, (3) absence of periodontal ligaments and (4) peri-implant disease. Main cause of the delay in research can be attributed to the fact that the mechanism of the strong bond between titanium and living bone (Ti-bone bond), an outstanding phenomenon which accidentally discovered 60 year ago has not been clarified. To improve the situation, we endeavor to the biochemical clarification of the mechanism of "Ti-bone bond". We systematically

analyzed the affinity of related proteins for titanium by using our original technology of titanium column chromatography. Abundant proteins such as serum albumin or lysozyme did not bind with titanium significantly. Instead, we found that casein and phosphovitin, both typical phosphoprotein bound strongly with titanium. Furthermore, we discovered that the proteins of SIBLING-family in bone matrix, which contains multiple serine-phosphate residues and a RGD sequence bound with titanium. More than 100 times higher amount of new bone compared with the control was found, when the bone SIBLING proteins was coated on titanium device (Zellez, Hi-Lex Co., Japan) and implanted into rat bone for one week. We called the proteins "implant protein" and are pursuing clinical application.

Reference: Kuboki et al.: Bio-Med Mat Eng 22 (2012) 283-28 and 24 (2014) 1539-15

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS2-1 硬組織界面における3次元微細構造解析

○平嶋 伸悟^{1,2,4}, 太田 啓介¹, 金澤知之進¹, 都合亜記暢^{1,3}, 岡山 聡子¹, 楠川 仁悟², 中村桂一郎¹

¹久留米大 医 顕微解剖

²久留米大 医 歯口セ

³久留米大 医 電顕室

⁴久留米大 高次脳疾患研

骨膜及び歯根膜は、骨及び歯牙の機能を維持する上で非常に重要な構造である。実際、歯科臨床においても、骨造成や歯周病治療、矯正治療では、それらの存在が治療の予後に大きく関連することが知られている。両組織とも様々な解析がなされてきたものの、その主体をなす強靱なコラーゲン線維がどのようにつくられるのか等、組織学的に未だ不明な点が多く残されている。これらを解明する事は、骨膜と歯根膜の組織構築における機能形態学的知見を深めるだけでなく、新たな治療法確立への一助となることが期待される。

近年、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いた連続断面観察法によって、電子顕微鏡レベルの高い空間分解能で3次元的に解析する手法が開発されてきた。その1つにFIB/SEM tomography法がある。これまでに我々は骨膜や歯根膜の3次元構造の解析を行ってきた。このFIB/SEM tomography法では得られたvoxel dataから形態解析のみならず、ベクトル空間における定量的な解析が可能となる。

本シンポジウムでは、我々が進めてきたFIB/SEM tomographyを基軸とした骨膜および歯根膜における細胞とコラーゲン線維との組織構築に関する解析の現在と今後の展望について報告する。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Three-dimensional ultrastructural analysis on hard tissue interface

○Hirashima S^{1,2}, Ohta K¹, Kanazawa T¹, Togo A^{1,3}, Okayama S¹, Kusakawa J², Nakamura K¹

¹Dept Anat, Kurume Univ Sch Med

²Dent Oral Med Center, Kurume Univ Sch Med

³EM Lab, Cent Res Unit of Kurume Univ Sch Med

⁴CMRIBD, Kurume Univ Sch Med

Periosteum and periodontal ligament (PDL) are essential tissue to maintain function of the bone and tooth. They are related to prognosis guided bone regeneration, periodontal and orthodontic treatment. Although both tissues have been analysed using various methods, three-dimensional (3D) architecture and process of collagen synthesis remains unclear. Elucidation of these points could contribute not only to deepen knowledge of functional morphology but also to establish new treatment for clinical dentistry.

Recently, 3D-reconstruction methods based scanning electron microscope (SEM) have been developed. One example is namely focused ion beam/scanning electron microscope tomography (FIB/SEM tomography). This method is described briefly below: A specimen is milled with a focused ion beam, and the new block face is imaged with SEM. This process is performed repetitively for a set number of times. It enables 3D architecture analysis of specimens, and furthermore quantitative analysis in coordinate space.

We have analysed periosteum and PDL using FIB/SEM tomography. In this study, we will demonstrate our new findings and future prospect about 3D-reconstruction analysis using FIB/SEM tomography.

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

SS2-2 3次元観察を基軸にした象牙質齲蝕の病態評価

○三浦 治郎¹, 清水 真人¹, 榎本早希子², 荒井 重勇²

¹阪大 院歯 総診

²名大 未来材料システム研

【目的】 微細構造の3次元の超微形態情報を得る手法においては、現在では集束イオンビーム観察加工法（FIB-SEM法）や電子線トモグラフィー法が、最も現実的な手法であると考えられる。一般にトモグラフィー法においては厚さ方向に対して大きな制約があるが、SSSEM（Serial-Slice SEM）法の一種であるFIB-SEM法は、集束イオンビームにより連続的に試料表面を切削し反射電子組成像を取得するため、トモグラフィー法のように試料の厚さ制限もなく広範囲かつ高分解能での3次元再構成を行うことが可能である。今回我々は、象牙質疾患である齲蝕において免疫電顕法とFIB/SEM法を併用し3次元的に金コロイド標識の局在を見ることで齲蝕の基質中に蓄積する糖化最終生成物（AGEs）の観察を行った。

【方法】 ヒト象牙質を脱灰し試料とした。試料は18nmの金コロイドによる免疫標識後に5%グルタルアルデヒド及び還元オスミウムで固定を行い、EMステイナー（日新EM）にて染色を行った。その後アルコール脱水後にエポキシ樹脂に包埋し直交配置型FIB-SEM（日立製、MI4000L）にて観察を行った。観察は5×5×5μm（10nmピッチ、500枚）にて行い、取得データの再構築を行った。

【結果】 厚切りの象牙質においても金コロイド標識が沈着し金コロイドの局在を観察することが出来た。齲蝕罹患象牙質においては、表層部において基質が破壊されている部位では基質内部にまでAGEが侵入しているのが観察され、齲蝕関連細菌の侵入様相および基質の変化を観察することが出来た。

【考察】 FIB-SEMを用いることにより、超微細領域において3次元的な観察による情報の乏しかった齲蝕罹患象牙質のAGEsの局在を3次元的に観察することが出来た。

【謝辞】 本研究は、文部省ナノテクノロジープラットフォーム事業および科学研究助成（基盤研究B 16H05517, 挑戦的萌芽 16K12877）による支援により実施されました。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

3-dimensional evaluation of dentinal caries using FIB/SEM tomography

○Miura J¹, Shimizu M¹, Enomoto S², Arai S²

¹Div Interdisci Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Inst Mater Systems for Sustainability, Nagoya Univ

The use of focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM) has contributed to great advances in several areas of dental research, such as ultrastructural morphology, cariology and material sciences. We applied FIB/SEM observation to the block surface and TEM observation for ultra-thin sections. Scanned pictures (500 slices) were reconstructed as 3D images using software for evaluation of sound and caries-affected regions of human dentin. Dentin was fixed in 4% paraformaldehyde, and was cut longitudinally into 1-mm sections using a low-speed diamond saw. TEM: Non-decalcified teeth were embedded in EPON, sliced into thin sections and observed. Teeth were decalcified for 2 weeks in 10% EDTA, and were then paraffin-embedded and sectioned with a microtome. Sections were stained with anti-Advanced Glycation Endproducts (AGEs) and anti-collagen antibodies. The localization of AGEs in caries-affected dentin was similar to areas showing bacterial invasion. The major advantages of the FIB/SEM method are the ability to visualize micro-scale 3D images and observe relatively large structures, such as bacterial colonies. The ultrastructure of the amount of AGEs varied markedly in the dentinal caries region. The increase in AGEs in caries-affected regions may influence the progression of dental caries. This immunohistochemical data on carious dentin should provide more useful information for carious infection.

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

SS2-3 骨細胞ネットワーク形成に与えるコラーゲン線維集束化の関与

橋本 真奈¹, 長岡 紀幸², 飯村 忠浩³, 大嶋 佑介³, 原 徹⁴, 〇上岡 寛¹

¹岡大 院医歯薬 歯科矯正

²岡大 歯 歯先端研セ

³愛媛大 PROS バイオイメーキング

⁴国立研究開発法人 物質・材料研究機構

【背景・目的】骨細胞は細く長い突起で細胞性ネットワークを形成し、メカニカルストレスの感知といった重要な役割を担っていると考えられているが、この細胞性ネットワークがどのように形成されているのかは未だ不明である。一方、直交配置型 FIB-SEM は一度の撮影で三次元情報をマルチスケールで捉えることが可能である。そこで今回我々は、直交配置型 FIB-SEM を用いてモデリング期の骨組織における骨系細胞ならびにコラーゲン細線維の三次元構築を行い、骨細胞ネットワーク形成に与えるコラーゲン細線維集束化の影響を解析した。**【方法】**ニワトリ胚頭蓋骨を固定、電子染色後、直交配置型 FIB-SEM を用いて 1 辺 25 μm の立方体領域を 25 nm/pixel の解像度で約 1000 枚の連続画像を取得した。その後 Amira ソフトウェアを用いて骨系細胞とコラーゲン細線維の三次元構築を行い両者の位置関係を解析した。さらにコラーゲン線維束の形成に必要な架橋を阻害する β -Aminopropionitrile (BAPN) をニワトリ胚に投与し、頭蓋骨の骨細胞を共焦点レーザー顕微鏡システムで観察した。その後 Amira で形態計測を行い、BAPN 投与群と対照群との骨細胞ネットワーク形成を比較した。また、多光子励起顕微鏡による Second Harmonic Generation (SHG) 観察法を用いてコラーゲン線維束を観察・比較した。**【結果】**直交配置型 FIB-SEM で観察された骨細胞の突起は、架橋により集束したコラーゲン線維束を避けるように伸びていた。BAPN を投与することでコラーゲンの集束が阻害されることを SHG 顕微鏡で確認できた。コラーゲンの集束が阻害された BAPN 群は対照群と比較して、著しく極性に乏しい骨細胞ネットワークを形成していた。**【考察・結論】**コラーゲン線維集束化が骨細胞ネットワーク形成に影響を与えることが示唆された。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

The osteocyte network formation is influenced by the collagen-bundle formation

Hashimoto M¹, Nagaoka N², Iimura T³, Oshima Y³, Hara T⁴, 〇 Kamioka H¹

¹Dept Orthodont Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

²ARCOCS Okayama Univ Sch Dent

³Div Bio Imaging PROS Ehime Univ

⁴NIMS

AIM: Osteocytes form the cellular network by their long processes and act as mechanosensory cells in bone. However, it is unknown how this cellular network is formed and what kind of factors influence the network formation. Focused ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM) has increasingly found use in biological research. The main application is in the acquisition of three-dimensional data by tomography. We therefore reconstructed three-dimensional images of the osteocyte network as well as the collagen fibrils during bone modeling. Based on the positional relationships of osteocytes and collagen fibrils, we analyzed the influence of the collagen bundle formation on the osteocyte network formation.

RESULTS: Three-dimensionally reorganized images obtained using FIB-SEM revealed that osteocyte processes elongate into the bone matrix while avoiding the thick collagen bundles with a diameter exceeding several micrometers due to cross-linkage. In our BAPN experiments, we observed significant differences in the osteocyte network formation of the calvaria administered BAPN versus the control

calvaria with respect to loss of regularity. In addition, the multi-photon microscopy-based second harmonic generation (SHG) images confirmed low regularity in collagen bundle organization in the calvaria administered BAPN.

CONCLUSION: Our findings suggested that the osteocyte network formation was influenced by the thick collagen-bundle formation. We have considered the possibility of matrix-oriented osteocyte network formation.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS2-4 インプラント/骨界面の3次元観察

○長岡 紀幸¹, 吉原久美子², 丸尾 幸憲³

¹岡大 院医歯薬 歯先端研セ

²岡大病院 新医療研開セ

³岡大病院 咬合・義歯補綴

表面処理されたチタン製インプラントと再生骨界面を3次元観察した。

インプラントは、ラットによる動物実験と電子顕微鏡観察用試料が作製し易い形状に設計された。機械加工されたチタン製インプラントは、80°Cの3 mss%過酸化水素水中に3時間浸漬した。蒸留水で洗浄後、大気雰囲気のマッフル炉中で、400°C、1時間の熱処理を施した。インプラントは、ウイスター系ラットの大腿骨に埋入し、4ヶ月後に摘出した。T. J. Deerinckらの方法 (T. J. Deerinck et al.; NCMIR methods for 3D EM) を参照し、固定、染色した。インプラント/骨界面の3次元観察法として、集束イオンビーム加工装置-走査電子顕微鏡複合装置 (FIB-SEM) によるシリアルセクション法を用いた。SEM像は20nm/pixelの解像度で20×20μmの領域を観察した。FIBは20nmステップでスライス加工し、971枚のSEM像を観察した。3次元観察した全領域において、インプラント/骨界面を界面での剥離なしに観察できた。界面近傍の骨組織中に骨細胞が観察された。

本研究は、文部科学省委託事業ナノテクノロジープラットフォーム課題として物質・材料研究機構微細構造解析プラットフォームの支援を受けて実施されました。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

3D observation of the titanium implant and bone tissue interface

○Nagaoka N¹, Yoshihara K², Maruo Y³

¹ARCOCS, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

²Center Innov Clinic Med, Okayama Univ Hosp

³Dept Occlusal Oral Funct Rehabil, Okayama Univ Hosp

The interface between the surface-treated titanium implant and bone was observed 3-dimensional. The titanium implants were immersed for 3 hours in 3 mss% hydrogen peroxide solution of 80°C. The implant was washed with distilled water and heat-treated for 1 hour in a muffle furnace at 400°C atmosphere. The implant is implanted in the femur of wistar rats were removed after 4 months. 3-dimensional observation method of implant / bone interface was used for serial sectioning method by a FIB-SEM. The implant and the bone interface was observed without delamination at the interface. The vicinity of the interface between the implant and the bone, a bone cell was observed.

This study was supported by NIMS Nanofabrication Platform in Nanotechnology Platform Project sponsored by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

SS2-5 FIB-SEM を用いた 2 型糖尿病モデルラットにおける骨-インプラント結合の形態学的解析

○川本真一郎¹, 橋口 千琴², 藺村 貴弘³, 西村 正宏¹

¹鹿大 院医歯 口腔顎顔面補綴

²鹿大 院医歯 歯周病

³金沢医大 医 解剖 2

2 型糖尿病は、骨代謝への影響と軟組織の創傷治癒遅延や易感染性から、インプラント治療の相対禁忌症とされているが、糖尿病が及ぼす骨-インプラント結合への影響、および、抗糖尿病薬による血糖のコントロールによる骨-インプラント結合の改善の程度は、これまでの報告や治療のガイドラインからも未だ明確に示されていないのが現状である。

そこで本研究では、糖尿病と抗糖尿病薬による治療が、骨-インプラント結合へ与える影響について、糖尿病モデル動物を用いて解析を行い、2 型糖尿病におけるインプラント治療の適否を判断する上でより客観的な基礎医学的根拠を供給することを目的とした。

Wistar ラット由来の 2 型糖尿病モデルラットを、糖尿病群と、これに経口糖尿病薬 voglibose を投与した治療群に分け、それぞれ実験用インプラントを両側脛骨に埋入した。埋入 3 週後と 9 週後に、右側に埋入されたインプラントを生体力学的に評価し、左側のインプラントは組織学的形態を評価した。またその試料の一部は集束イオンビーム-走査電子顕微鏡 (FIB-SEM) を用いて、非脱灰樹脂包埋の状態でも FIB によって連続的に milling し、SEM により骨-インプラント界面の超微形態観察を試みた。FIB-SEM は、本研究のように、骨-インプラント界面の超微形態を解析する上で極めて強力なツールとなり得るが、未だその観察に最適な前処理、染色法は完全に定まっていない。今回はそれらの技術的な面についても議論を深めたい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Morphological observation of bone formation around titanium implants using FIB-SEM in type 2 diabetic rats

○Kawamoto S¹, Hashiguchi C², Sonomura T³, Nishimura M¹

¹Dept Oral Maxillofac Prosthodont, Grad Sch Med Dent Sci, Kagoshima Univ

²Dept Periodontol, Grad Sch Med Dent Sci, Kagoshima Univ

³Anat II, Kanazawa Med Univ

Type 2 diabetes mellitus (DM2) has a deleterious effect on dental implant integration into alveolar bone. However, whether controlling blood glucose with antidiabetic drugs is sufficient to improve implant integration is unclear. This study was designed to investigate whether DM2 effects on bone formation around titanium implants into rat tibia in very early stage.

We used spontaneous DM2 model rats, and Wistar rats were used as a control. DM2 model rats were divided into two groups: those with DM2 alone and those with DM2 rats improved glucose level with medication (voglibose) to examine the bone metabolism around implants. Five rats from each group were sacrificed at 3 and 9 weeks post-surgery, then the removal torque strength of implants in the right tibiae was measured to evaluate their osseointegration. Implants in the left tibiae were processed for undecalcified sectioning and histological study.

Furthermore, to observe ultrastructure of interface of bone-titanium implants with SEM, some of the left tibiae were milled continuously with scanning electron microscopy combined with focused ion beam milling (FIB-SEM). Although positive and negative staining electron microscopic protocol for hard tissue remain to be established, FIB-SEM may be a powerful tool for the high-resolution analysis of interface of bone-titanium implants.

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

SS3-1 オーバービュー (受容体を介する薬物作用機序の新概念)

○谷村 明彦

北医療大 歯 薬理

アセチルコリンは神経伝達物質として神経終末から放出され、ニコチン性アセチルコリン受容体やムスカリン性アセチルコリン受容体を活性化することが広く知られている。また、これらの受容体に対するアゴニストやアンタゴニストに加えて、アセチルコリン分解酵素であるコリンエステラーゼを標的とする化合物が医薬品として利用されている。しかしこれらの化合物の作用の中には、必ずしも従来の考え方が適用できないものが報告されている。本シンポジウムでは、神経性および非神経性アセチルコリンの生理的役割と、アセチルコリン受容体や分解酵素に作用に関する新しい知見を紹介する。

2012年にR.J. LefkowitzとB.K. Kobilkaが「Gタンパク質共役受容体の研究」でノーベル賞を受賞した。この研究ではGPCRの脱感作に関与する β アレスチンが、受容体とGタンパク質の相互作用を遮断するのみならずMAPキナーゼ系の活性化に関与することが明らかにされた。さらにGタンパク質系あるいは β アレスチン系を選択的に活性化するバイアスリガンドや、リガンド結合部位以外に作用するアロステリックモジュレーターの有用性が明らかになった。この発見によって、受容体親和性やサブタイプ特異性とは異なるコンセプトに基づいた新しい医薬品の開発が注目されている。またこの考えに基づくと、これまで「非特異的作用」として重要視されて来なかった現象や化合物の中に、新しい治療法や治療薬が見出される可能性も考えられる。同様の考えは、チャンネル型受容体やコリンエステラーゼを標的とする化合物について適用することができる。このような新しい考えを取り入れ、これまでの固定概念や先入観に捕らわれない自由な発想で受容体薬理学について議論したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Overview (New concept for receptor-mediated signaling)

○Tanimura A

Div Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Acetylcholine (ACh) is neurotransmitter at autonomic ganglia, motor nerves, and central nerve systems, and activates nicotinic ACh receptors (nAChR) and muscarinic ACh receptors (mAChR) on the post-synaptic membrane. Acetylcholinesterase (AChE), also located on the post-synaptic membrane, terminates the signal transmission by hydrolyzing ACh into choline and acetic acid. Compounds that manipulate these receptors by acting as agonists or antagonists, and that inhibit AChE have been used for the treatment of many pathophysiological conditions. However, effects of these compounds are not always explained with these traditional concept. This symposium demonstrates novel findings concerning the physiological roles of neuronal and non-neuronal ACh, and the effects of drugs that had been thought to act on the ACh receptors and AChE.

The Nobel Prize in Chemistry 2012 was awarded jointly to R.J. Lefkowitz and B.K. Kobilka “for studies of G-protein-coupled receptors (GPCR)”. In their findings, the ligand-biased signaling and allosteric modulation of GPCR, including muscarinic receptors, offer pharmacological approaches that may enable the modulation of only therapeutically desirable signaling pathways. Similar idea would also be applicable to the nicotinic receptor, the ligand-gated ion channel. We hope to discuss new ideas about the receptor pharmacology that were not bound by fixed concepts and preconceived notions.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS3-2 骨再生医療におけるアセチルコリンエステラーゼ阻害薬の新たな展開

○佐藤 毅, 依田 哲也

埼玉医大 医 口腔外科

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤であるドネペジルはアルツハイマー病で最も頻用される薬剤として知られているが, 最近のケースコントロール研究で, ドネペジル服用患者は非服用患者と比較して骨折リスクが低いことが報告された. この研究から, ドネペジルが骨組織に作用する可能性が示唆され, われわれは AChE およびドネペジルの骨代謝への影響を検討した.

AChE は破骨細胞形成を促進し, 骨髄細胞に RANKL を作用させることで AChE 発現が上昇した. 骨髄細胞において AChE をノックダウンすると RANKL 依存性の破骨細胞誘導は著しく抑制された. また, AChE は骨髄細胞において RANK 発現を上昇させた. 興味深いことに, ドネペジルはアポトーシスを誘導せず, TRAP 陽性の破骨細胞形成を抑制した. このことから, 破骨細胞の培養上清にはアセチルコリンは存在しないことが示唆された.

一方で, ドネペジルは骨髄細胞の RANKL 受容体である RANK 発現を減少させ, c-fos 発現低下および Id2 発現上昇を伴い破骨細胞分化を抑制した. さらに, 成長期マウスに 3 日間 RANKL 投与を行い骨量低下を誘導させる系において, ドネペジルを予防的に 3 日間投与すると骨吸収が抑制された. これらの結果から, ドネペジルは骨粗鬆症や歯周病といった骨減少症に対して, 骨量を増加させる有益な薬剤になると考えられる.

【利益相反】 なし

New strategy for acetylcholinesterase inhibitors in bone regenerative medicine

○Sato T, Yoda T

Dept Oral and Maxillofac Surg, Fac Med, Saitama Med Univ

Donepezil, an inhibitor of acetylcholinesterase (AChE), is a common medication for Alzheimer's disease. Interestingly, a recent case-control study found that administration of this agent is associated with lower risk of hip fracture independently of falling, suggesting its direct effect on bone tissues as well. We analyzed the effect of AChE and donepezil on bone metabolism.

Recombinant AChE promoted osteoclast differentiation and RANKL upregulated AChE expression in bone marrow macrophages (BMMs). RNA interference-mediated knockdown of AChE significantly inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation. AChE upregulated expression of RANK in BMMs. Intriguingly, we found that donepezil did not induce TUNEL-positive cells, but inhibited TRAP-positive osteoclast formation, suggesting that acetylcholine is not accumulated in RANKL-treated BMMs cultures.

Donepezil decreased RANK expression in BMMs, resulting in the inhibition of osteoclast differentiation with downregulation of c-Fos and upregulation of Id2. Moreover, administration of donepezil prevented RANKL-induced bone loss in vivo, which was associated with the inhibition of bone resorption on day 3 in growing mice. These results suggest that donepezil may be a promising regenerative agent for osteopenia such as osteoporosis and periodontal disease.

Conflict of Interest: None

SS3-3 骨吸収性疾患の治療ターゲットとしての $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体

○佐伯万騎男¹, 江草 宏²

¹新潟大 院医歯 歯科薬理

²東北大 院歯 分子・再生補綴

骨が神経系の調節を受けていることは、多くの研究で明らかになりつつある。特に交感神経系が骨量を抑制的に支配していることについては多くの報告がある。一方、副交感神経系に関しては、解剖学的なエビデンスも乏しく、不明な点が多い。近年、非神経系細胞から放出されるアセチルコリンが、末梢で様々な生理作用に働いているとの知見が集積しつつある。この非神経性アセチルコリンのターゲットとして、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体が注目を集めている。 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体はマクロファージに発現することが知られており、免疫系を迷走神経刺激が抑制する、いわゆる inflammatory reflex が提唱されている (1)。しかしながら、副交感神経と破骨細胞との関係についてはこれまで知られていなかった。我々は NFAT ルシフェラーゼベクターを RAW264.7 細胞に発現させた cell-based アッセイ系を構築し、ライブラリースクリーニングにより、コリンエステラーゼ阻害剤である phenserine が破骨細胞に及ぼす作用を見出したことを端緒として、さらにアセチルコリン受容体拮抗薬について検索を行い、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体阻害薬の methyllycaconitine (MLA) が、破骨細胞分化を抑制すること、ラット頭蓋骨欠損モデルにおいて MLA が骨再生効果を持つことを明らかにした。本サテライトシンポジウムでは、非神経性アセチルコリンが骨代謝に及ぼす影響について議論したい。

1. Tracey et al. Nature (2003)

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

$\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor: a promising therapeutic target for osteoporosis

○Saeki M¹, Egusa H²

¹Niigata Univ Grad Sch Med Dent, Sci Div Dent Pharmacol

²Tohoku Univ Grad Sch Dent, Div Mol Regen Prosthodont

Small molecule compounds that potently affect osteoclastogenesis could be useful as chemical probes for elucidating the mechanisms of various biological phenomena, and as effective therapeutic strategies against bone resorption. An osteoclast progenitor cell-based high-throughput screening system was designed to target activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT), which is a key event for osteoclastogenesis. Chemical compound library screening using this system identified phenserine, cholinesterase inhibitor, to be an NFAT regulator in osteoclasts. Phenserine promoted receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL)-induced NFAT activity in RAW264.7 cells and also promoted the formation of TRAP-positive multinucleated osteoclasts from RAW264.7 cells and mouse primary bone marrow macrophages (BMMs) in a concentration-dependent manner. We next investigated several acetylcholine receptor subtype inhibitors and found that methyllycaconitine (MLA), $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) antagonist inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells and BMMs. When standardized bone defects in rat calvariae were filled with a collagen sponge containing MLA or PBS (control), significantly enhanced resorption of the grafted collagen sponge and new bone formation was observed within and surrounding the sponge in the peptide group. The $\alpha 7$ nAChR is an essential component of the cholinergic anti-inflammatory pathway which was discovered as a neuroimmune regulation pathway for decades. We hypothesized that activation of $\alpha 7$ nAChR may play an important role on osteoclastogenesis.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS3-4 ムスカリン性アセチルコリン受容体の神経精神薬理学

○田熊 一敏^{1,2}, 長谷部 茂¹, 中澤 敬信^{1,3}, 橋本 均^{2,3}, 松田 敏夫⁴, 吾郷由希夫³

¹阪大 院歯 薬理

²阪大 院 小児発達

³阪大 院薬 神経薬理

⁴阪大 院薬 薬物治療

代表的な精神疾患である統合失調症の患者死後脳において、ニコチン性アセチルコリン(ACh)受容体(ニコチン受容体)あるいはムスカリン性ACh受容体(ムスカリン受容体)の発現レベルが低下していること、ならびに $\alpha 7$ ニコチン受容体の内因性アロステリック阻害因子の産生が増加していることが見出され、統合失調症の病態発現におけるACh神経機能低下の関与が示唆されている。このような背景により、統合失調症の認知機能障害を対象としてアルツハイマー病治療薬として臨床応用されるAChエステラーゼ阻害薬の補助療法が検討され、ガラントミンが改善作用を示すこと、一方で、ドネペジルは改善作用を示さないことが報告された。そこで我々は、精神疾患モデル動物を用いてガラントミンとドネペジルの臨床における薬理的なプロファイルの違いを追究した。統合失調症患者の多くで認められるプレパルスインヒビション(PPI)障害に対する改善作用において、臨床報告と一致するガラントミンとドネペジルの薬理的差異を見出し、ガラントミンの改善効果がニコチン受容体ではなく、ムスカリン受容体、特にムスカリンM1受容体の活性化を介することを明らかにした。また逆に、ドネペジルが軽度なムスカリンM1受容体拮抗作用を有することを明らかにした。本サテライトシンポジウムでは、ガラントミンの薬理学的特性に関する追究から見出した「精神疾患とACh神経系の関わり」を紹介し、神経精神薬理学におけるムスカリン受容体の重要性について議論したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Neuropsychopharmacology of muscarinic acetylcholine receptors

○Takuma K^{1,2}, Hasebe S¹, Nakazawa T^{1,3}, Hashimoto H^{2,3}, Matsuda T⁴, Ago Y³

¹Dept Pharmacol, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Osaka Univ United Grad Sch Child Dev

³Lab Mol Neuropharmacol, Osaka Univ Grad Sch Pharm Sci

⁴Lab Med Pharmacol, Osaka Univ Grad Sch Pharm Sci

Accumulating evidence suggests that central cholinergic dysfunction plays a role in the pathophysiology of schizophrenia. Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs), currently used for the treatment of Alzheimer's disease, have been evaluated as adjunctive therapy for the cognitive dysfunction of schizophrenia. However, clinical studies show that galantamine, a weak AChEI and allosteric potentiator of nicotinic ACh receptors (nAChRs), improves negative and cognitive symptoms in schizophrenia, while donepezil, a potent AChEI, does not. We have demonstrated that galantamine, but not donepezil, ameliorated deficits of prepulse inhibition (PPI), sensory information-processing deficits, in isolation-reared mice. We further found that the ameliorating effects of galantamine on PPI deficits were blocked by the muscarinic ACh receptor (mAChR) antagonists scopolamine and telenzepine (preferential for M1 subtype), but not by nAChR antagonists. This review summarizes the current status on the neuropharmacology of mAChR in psychiatric disorders.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS3-5 片頭痛病態に関わるセロトニン及びセロトニン受容体の作用

○崔 翼龍

理研 ライフサイエンス技術基盤研究セ 分子動態イメージング研究

片頭痛はズキンズキンとした拍動性の痛みが4-72時間持続する機能性頭痛であるが、その発生機序として、血管の異常拡張により血漿タンパク質などが周辺の脳実質内に漏出して神経原性炎症を引き起こし、その炎症反応が血管周辺の三叉神経終末を刺激して脳内の上位中枢に伝達され痛みとして認知されるという「三叉神経血管説」が提唱されている。一方、片頭痛発作によって、血小板中のセロトニンが減少し、その主な代謝物である5-HIAAが尿中で増加すること、またセロトニンが片頭痛発作を頓挫させることなどから、セロトニンとその受容体の片頭痛病態への関与が指摘されてきた。セロトニン5-HT_{1B/1D}受容体のアゴニストであるトリプタン系薬物は硬膜や血管周辺の三叉神経終末の5HT_{1D}受容体に作用して血管拡張性ペプチド Substance P や Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)の放出を抑制すること、血管平滑筋の5HT_{1B}受容体に作用して血管を収縮させることから片頭痛の頓挫薬として広く使われている。これらの多くのトリプタン系薬物あるいはセロトニンは脳血液関門を通過できないことから、片頭痛病態へのセロトニンの関与は末梢機序を中心に考えられてきたが、近年、片頭痛発作の間歇期において脳内のセロトニントランスポーターの活性が促進されること、セロトニン合成が低下していることが報告され、中枢性セロトニンの片頭痛病態への関与も注目されるようになった。本シンポジウムでは、脳内のセロトニンが大脳皮質の抑制性ニューロンのセロトニン受容体を介して、神経興奮性を調整し、片頭痛病態に関わるというわれわれの新たな所見も合わせて紹介したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Involvement of serotonin and serotonin receptors in the migraine pathophysiology

○Cui Y

Mol Dynamics Imaging Unit, RIKEN Center for Life Sci Technol

Migraine headache is thought to be triggered by intracranial neurogenic inflammation that activates trigeminal nociceptors in meningeal blood vessels. On the other hands, serotonergic dysfunction has long been implicated in the pathophysiology of migraine. Numerous studies have shown a reduction in platelet serotonin with elevation of its metabolites during the phases of a migraine attack. Moreover, intravenous administration of serotonin or “triptans”, a kind of selective 5-HT_{1B/1D} receptor agonist, aborts migraine attacks via inhibition of 5HT_{1D}-dependent release of SP/CGRP from trigeminal nerve terminal and 5HT_{1B}-dependent vasodilation. Since serotonin and sumatriptan hardly pass through the blood brain barrier, it has been thought that the vascular or peripheral serotonergic system might contribute to migraine pathophysiology. However, recent clinical and experimental reports have suggested that a low brain 5-HT disposition may also facilitate migraine, such as the serotonin transporter availability was increased and the serotonin synthesis was decreased in migraine patients during a pain-free interval. These observations indicate that low brain 5-HT disposition may also be involved in migraine pathophysiology, especially in the chronic phase of migraine. In this symposium, we will also discuss whether and how the brain serotonergic system contributes to migraine facilitation.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS3-6 コリン作動性ニューロンによる側坐核中型有棘細胞の機能調節

○小林 真之

日大 歯 薬理

口腔領域の常同的な不随意運動であるオーラルジスキネジアには、中枢ドパミン神経系の投射先である側坐核 shell におけるアセチルコリンの作用が深く関与している。側坐核は、その 95% が GABA 作動性中型有棘 (medium spiny; MS) 細胞で構成されており、同細胞は主に淡蒼球へ投射している。興味深いことに、側坐核の 1-2% を占める大型無頂棘細胞はコリン作動性である。したがって側坐核のコリン作動性ニューロンは、局所的に MS 細胞の活動性を変調させて、側坐核の機能を修飾していると考えられている。しかし、その修飾作用のメカニズムは不明な点が多い。

そこで我々は、側坐核 shell の MS 細胞に対するアセチルコリンの作用について検討してきた。側坐核に存在するコリン作動性ニューロンと MS 細胞から同時にホールセル記録を行い、MS 細胞の連続発火に先行してコリン作動性ニューロンを発火させたところ、MS 細胞の連続発火頻度が抑制されるものが認められた。この結果は、局所神経回路を構成するコリン作動性ニューロンから放出されるアセチルコリンによって、MS 細胞の発火頻度が調節されていることを示している。

さらに、MS 細胞間および fast-spiking 細胞から MS 細胞への抑制性シナプスに対するアセチルコリンの影響を検討した。その結果、MS 細胞間の抑制性シナプス後電流はムスカリン型受容体を介して抑制される一方、fast-spiking 細胞から MS 細胞への抑制性シナプス後電流は、ニコチン型受容体を介して増大することが明らかになった。

以上の所見は、側坐核に存在するコリン作動性ニューロンが MS 細胞の発火特性や抑制性シナプス入力を変調させて、その活動性を精細に制御していることを示唆する。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Cholinergic regulation of medium spiny neuron activity in the rat nucleus accumbens

○Kobayashi M

Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent

Medium spiny neurons (MSNs) in the nucleus accumbens (NAc) are the principal neurons, whose neural activities are regulated by GABAergic inputs from MSN and fast-spiking interneurons (FSNs). Cholinergic interneurons play important roles in regulating neural activities of MSNs; however, it is still unknown how acetylcholine modulates MSN activities. We first tested the effects of the activation of cholinergic interneurons on the electrophysiological properties of MSNs by multiple whole-cell patch-clamp recordings. Repetitive spike firing of a cholinergic interneuron induced an increase in the rheobase, which delayed the action potential initiation in MSNs. Second, we performed paired whole-cell patch-clamp recordings from MSNs and FSNs, and examined the nicotinic and muscarinic effects on unitary inhibitory postsynaptic currents (uIPSCs). Bath application of carbachol suppressed uIPSCs between MSNs, and this effect was antagonized by preapplication of atropine, and was mimicked by pilocarpine but not by nicotine. In contrast, FSN to MSN connections showed little effect of pilocarpine on uIPSCs, whereas nicotine enhanced uIPSCs. These results suggest that excitability of the NAc MSNs is precisely regulated by muscarinic and nicotinic receptors.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS4-1 神経障害性疼痛発症に対する三叉神経節内ニューロン-グリア機能連関の関与

○梶 佳織^{1,2}, 篠田 雅路¹, 清水 典佳², 岩田 幸一¹

¹日大 歯 生理

²日大 歯 矯正

歯科臨床の現場において下顎第三大臼歯の抜歯や顎顔面矯正手術などの偶発症として下歯槽神経が損傷すると、損傷を受けていない三叉神経によって支配されている口腔顔面領域に異常疼痛が引き起こされることがある。これまでの研究から、下歯槽神経切断により異所性機械痛覚過敏が発症することが知られ、そのメカニズムが徐々に解明されつつあるが、その発症機構に関しては不明な点が多く残されている。そのため、臨床の現場では姑息的な治療が行われ、原因療法を実施することができないのが現状である。近年、神経損傷による痛覚過敏の発症機構の一つとして、感覚神経節内における主要なギャップ結合構成タンパク質である Connexin 43 (Cx43) およびサテライトグリア細胞の可塑的变化が一次ニューロンの興奮性調節に重要な役割を果たすことがわかってきた。そこで、本研究ではこの点に注目し、行動学的、免疫組織化学的および行動薬理学的手法を用いて下歯槽神経損傷によって誘発されるラットの口髭部皮膚における機械痛覚過敏発症に対して、三叉神経節 (TG) に発現する Cx43 がいかなる役割を有するかを解明し、神経損傷に起因する異所性痛覚過敏の新たな治療法の開発に寄与する基礎的データを得ることを目的とし、下歯槽神経損傷後に発症する顔面部異所性機械痛覚過敏に対する Connexin 43 の関与を検討した。感覚神経節における Cx43 により構成されているギャップ結合を介したサテライトグリア細胞の活性化の伝播が、神経障害性疼痛発症に重要な役割を果たしていることが示唆されていることから、ニューロンとサテライトグリア細胞の機能連関の可能性について探求する。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Involvement of neuron-glia interaction in the trigeminal ganglion in neuropathic pain

○Kaji K^{1,2}, Shinoda M¹, Shimizu N², Iwata K¹

¹Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

²Dept Orthodont, Nihon Univ Sch Dent

It is well known that inferior alveolar nerve (IAN) injury induces ectopic pain spreading to the orofacial region innervated by the uninjured nerves. However, the exact mechanism is not still solved. The aim of present study is to clarify the role of Connexin 43 (Cx43) in the trigeminal ganglion (TG) in mechanical hypersensitivity in rat whisker pad skin associated with IAN injury. We examined changes in mechanical sensitivity and Cx43 expression in the TG following IAN transection (IANX). We also investigated the effect of selective gap junction blocker (Gap27) on the mechanical allodynia and Cx43 expression. Cx43 was expressed in the activated satellite glial cells (SGCs) encircling TG neurons innervating the whisker pad skin, and the Cx43 protein expression was significantly increased after IANX. Administration of Gap27 into the TG significantly reduced SGC activation and mechanical hypersensitivity. These findings indicate that the SGC activation propagates within the TG via gap junctions composed of Cx43 following IANX and ectopic mechanical hypersensitivity occurs in the whisker pad skin, suggesting that spreading of activated SGCs throughout the TG via gap junctions is the pivotal role in ectopic orofacial neuropathic pain following IANX.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS4-2 エナメル質形成におけるプロテアーゼの役割

○進 正史^{1,2}, 岡本富士雄¹, 鍛冶屋 浩¹, 緒方佳代子¹, 岡部 幸司¹

¹福歯大 細胞生理, ²オハイオ州立大 歯 生物科学

歯のエナメル質形成には amelogenin, ameloblastin, enamelin 等のエナメル質タンパクがエナメルマトリックス中に分泌される。一方、これと同時にプロテアーゼである matrix metalloproteinase-20 (MMP20) や kallikrein-related peptidase-4 (KLK4) が分泌される。これらの酵素はエナメル質タンパクを分解し脱却することで、エナメル質の成熟化を促進する。MMP20 は分泌期のエナメル芽細胞に高発現し、amelogenin や ameloblastin を分解する。ヒト MMP20 遺伝子 (*Mmp20*) の変異はエナメル質形成不全症を引き起こし、*Mmp20* 欠損 (KO) マウスではエナメル質タンパクの分解不正やエナメル質の剥離が認められる。我々は MMP20 がオートクライン/パラクライン的に細胞間接着分子 cadherin を分解し、 β -catenin シグナルを介してエナメル質形成を制御すること、また、エナメル芽細胞特異的な β -catenin 欠損マウスではエナメル質形成が障害されることを明らかにした。さらに、MMP20 遺伝子を amelogenin プロモーターの下流に組替えた *Mmp20* トランスジェニック (Tg) マウスを検討した結果、transgene は *Mmp20*-KO マウスのエナメル質形成不全を正常方向に改善した。一方、正常な野生型マウスへの過剰発現では意外なことにエナメル質形成の著しい低下が認められた。これは MMP20 の発現が過少でも過剰でもエナメル質形成を障害することを意味し、エナメル質形成において MMP20 が cadherin/catenin の下流シグナルを調節することを示唆している。今後はエナメル芽細胞内でのシグナル伝達機構を *MMP20*-KO、-Tg マウスを用いて、*in vivo* 及び *in vitro* 実験系で解明していきたいと考えている。本研究はエナメル質形成の分子メカニズム解明のみならず、エナメル質形成不全症の病態解明への展開につながるものと期待している。

共同研究者 オハイオ州立大学 John Bartlett

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Role of proteinases in dental enamel development

○Shin M^{1,2}, Okamoto F¹, Kajiya H¹, Ogata K¹, Okabe K¹

¹Div Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll, ²Div Biosci, Ohio State Univ

Enamel matrix proteins amelogenin, ameloblastin and enamelin are secreted into enamel matrix during enamel development. Proteinases, matrix metalloproteinase-20 (MMP20) and kallikrein-related peptidase-4 (KLK4) are also secreted into the enamel matrix. These proteinases have roles to cleave enamel matrix proteins and to remove them from enamel. MMP20 is expressed in teeth. Mutations in *MMP20* cause *amelogenesis imperfecta* and *Mmp20* ablated mice have hypoplastic enamel that abrades from the underlying dentin. We demonstrated that MMP20 cleaved cadherin and regulated β -catenin signaling. β -catenin conditional knock-out mice have enamel defect. Transgenic mice that use the amelogenin promoter to drive *Mmp20* expression (*Mmp20*Tg) in the *Mmp20* ablated background, significantly improved the physical properties of their enamel. Surprisingly, when the highly expressing transgene was present in the wild-type (WT) background, the enamel became malformed. Therefore, too little or too much MMP20 is detrimental to enamel development. To better understand enamel formation, we are elucidating cellular signaling mechanism in ameloblasts by using *Mmp20*-KO and -Tg mice. This will advance our goal to clarify how enamel form and to use that knowledge for designing therapeutic approaches.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS4-3 ライブセル蛍光イメージングの口腔疾患予防への応用

○西出 真也, 藤岡容一朗, 堀内 浩水, 堀口 美香, 佐藤 絢, Prabha Nepal,
王 婧, 南保明日香, 大場 雄介

北大 院医 細胞生理

唾液分泌や睡眠覚醒など多くの生理機能は約 24 時間周期の概日リズムを示す。近年、概日リズムの概念を取り入れた投薬時刻決定など時間医学の考え方が広まってきている。不規則な生活習慣は睡眠障害のみならず肥満や口腔疾患の原因にもなる。生体の概日リズムは、細胞内で自律的に振動する時計遺伝子やタンパク質のリズムが器官、個体として統合されることにより形成される。我々は様々な蛍光タンパク質を利用したバイオセンサーを作製、細胞内で発現させ、その局在等の発現パターンを解析することにより概日リズムと疾患発症の関連を研究している。

時計タンパク質 CLOCK は BMAL1 分子と二量体を形成し、様々な遺伝子を 24 時間周期で転写促進することにより細胞のリズム発振に中心的な役割をもつ。CLOCK, BMAL1 の蛍光バイオセンサー SECFP-CLOCK, Venus-BMAL1 を細胞に導入し、異なる蛍光タンパク質同士が近接した際に起こるエネルギー移動である FRET (Förster resonance energy transfer) 現象を用いて両者の二量体形成を計測した。様々な時刻において測定を行った結果、CLOCK-BMAL1 二量体形成は明瞭な概日リズムを示した。

次に概日リズムが炎症に及ぼす影響を調べるため、MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) 活性の FRET イメージングによる測定系を構築した。MAPK の活性上昇により FRET が起こるように設計されたバイオセンサーを培養細胞に発現させ、炎症性刺激を与え FRET を解析した。MAPK の反応は時刻依存性を示し、細胞のリズムに応じて炎症反応が変化することが示唆された。夜型の生活習慣など生活リズムの乱れは口腔内の炎症にも影響を及ぼすことが考えられる。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Live cell fluorescence imaging for the prevention of oral diseases

○Nishide S, Fujioka Y, Horiuchi K, Horiguchi M, Satoh A, Nepal P, Wang J, Nanbo A,
Ohba Y

Dept Cell Physiol, Hokkaido Univ Grad Sch Med

Circadian rhythms are crucial for the regulation of many physiological processes, including the salivary secretion, and its concepts recently taken into consideration in clinical situations (eg., the optimal design of drug administration schedule). Arrhythmic lifestyles couple with not only sleep disorders but also oral diseases. The systemic circadian rhythms can be broken down into cellular rhythms, which are maintained by periodic changes in the status of a set of clock genes and proteins. The aim of this study was to gain a better understanding of how the cellular rhythm disorders contribute to disease pathogenesis.

To visualize cellular rhythms, we first constructed fluorescent biosensors for clock proteins, CLOCK and BMAL1, and observed their subcellular localization and interaction in living cells. These proteins form a heterodimer and play crucial roles in the generation of the cellular rhythm. Dimerization between CLOCK and BMAL1 evaluated by FRET (Förster resonance energy transfer) showed clear circadian rhythms. We next measured the activity of MAPKs (Mitogen-activated Protein Kinases), which control inflammatory responses, by FRET-based biosensors. Because MAPK activity showed a periodic change, circadian control of inflammatory response, together with life habits, might be involved in the pathogenesis of oral and other inflammatory diseases.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS5-1 口蓋の血管と神経の三次元的位置関係

○三輪 容子

日歯大 解剖 1

口蓋に分布する血管の吻合を検討するために、上行口蓋動脈、下行口蓋動脈および顔面動脈の枝を観察した。これらの枝が口蓋でいくつかの吻合を形成するのを観察した。顔面動脈の枝は上行口蓋動脈であり、顎二腹筋後腹の後面を通過し口蓋に達していた。また顎動脈の枝である下行口蓋動脈は舌根部粘膜から軟口蓋まで達していた。軟口蓋では扁桃枝として、上行咽頭動脈と吻合する小さな枝がみられた。蝶口蓋動脈の枝である鼻中隔の後鼻枝と大口蓋動脈は吻合を形成した。上行口蓋動脈はさらに、上行咽頭動脈と軟口蓋で吻合し、口蓋の筋に枝を送っているのが観察された。口蓋に存在する血管と同じ部位について、大口蓋神経および小口蓋神経、鼻口蓋神経、下顎神経、迷走神経と舌咽神経の走行を観察した。その結果、口蓋部では血管吻合や神経吻合がみられたことから機能的な重要性が示唆された。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Distribution of blood vessels and nerves at palatine by the three-dimensional positional observation

○Miwa Y

Dept Anat, Nippon Dent Univ

We examined the arrangement of artery, vein and nerves at palatine by macroscopic levels. We observed the branches of facial artery, descending palatine artery and ascending pharyngeal artery. These branches formed communication each other at palatine. The branches of facial artery is ascending palatine artery. It arises under cover of the posterior belly of the digastric. The branch of the maxillary artery is the descending palatine artery runs downwards, and supplies the mucous membrane of the root of the mouth. Several small rami which pass through the accessory palatine canals to supply the soft palate. The great palatine artery, which is the continuation of the descending palatine and ascends through the incisive foramen and communication with the posterior artery of the septum nasi. The ascending pharyngeal artery communication with palatine branch of the facial artery and descends into the soft palate with the levator veli palatine muscle. We also observed the arrangement of nerves from greater palatine and lesser palatine, nasopalatine nerve, branch of mandibular nerve, vagus nerve and glossopharyngeal nerve at same region of artery pass way the palatine.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS5-2 口蓋の微細血管構築

○戸田 伊紀

大歯大 解剖

固有口腔の上壁を構成する口蓋は、骨口蓋を基盤とする非可動性の硬口蓋と、筋を含む可動性の軟口蓋に分かれる。硬口蓋の粘膜は咀嚼粘膜であって、咀嚼・嚥下・構音に重要な役割を果たし、さらには床義歯の維持安定にも貢献するところが大きい。一般に、口蓋に分布する血管は顎動脈の分枝である下行口蓋動脈が大口蓋動脈と小口蓋動脈に分岐し、それぞれ骨口蓋に開口する大口蓋孔と小口蓋孔から硬口蓋と軟口蓋に分布している。そこで、演者らが行ったネコ、ニホンザル、コモンスザルの口蓋の微細血管鋳型標本の走査電顕観察から口蓋とくに硬口蓋の微細血管構築について述べる。硬口蓋では、大口蓋動脈が前走しつつ分岐して、粘膜下組織動脈網を形成していた。粘膜下組織動脈網から表層に向かって細動脈が派出し、固有層内に固有層動脈網を形成していた。固有層動脈網からさらに細枝を派出して、上皮直下に上皮毛細血管網を形成していた。この上皮毛細血管網から固有層乳頭に毛細血管ループを出していた。ループはほとんど単純なヘアピン型であった。一方、毛細血管ループの下行脚は、静脈側の上皮毛細血管網を経て、次第に集合し固有層動脈網と同じ深さにある固有層静脈網に流入していた。この静脈網から粘膜下組織へ細静脈を出し、粘膜下組織静脈網に流入していた。このような観察結果から、横口蓋ヒダが発達しているネコでは粘膜下組織血管網がヒダに一致して厚くなり、ニホンザルやコモンスザルでは固有層血管網がヒダの部分で厚くなってヒダを構成していた。上皮毛細血管網はいずれの動物にも認められた。このような形態は、各動物の食性に関連した横口蓋ヒダの形態に一致し、特にヒトの横口蓋ヒダは発達が悪いので、微細血管構築は霊長類のニホンザルやコモンスザルに類似していると考えられる。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Microvascular architecture of the palatine mucosa

○Toda I

Dept Anat, Osaka Dent Univ

In general, the hard palatine mucous membrane has been recorded as the masticatory mucosa, as being immovable, and serves to perform important roles such as in swallowing, mastication and vocalization. In prosthodontic dentistry, the condition of the hard palatine mucosa should be examined in order to maintain any plate-type dentures in a state of stability in the mouth. Detailed observations were made of the microvasculature of the palatine mucous membrane of some mammals by means of the plastic injection method under a scanning electron microscope. The branches of major palatine artery formed the submucous arterial network. Arterioles diverging from this network were directed to the epithelial surface and formed an arterial network in the lamina propria. Further, capillaries diverging from the latter network built up the subepithelial capillary network immediately beneath the epithelium. Capillary loops sprouting from the capillary network were found in the form of a simple hair-pin.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS5-3 口蓋微小循環の形態と機能

○松尾 雅斗¹, 高橋 俊介², 浜田 信城³

¹神歯大 院歯 口腔科学・歯科形態

²神歯大 院歯 循環制御歯科

³神歯大 院歯 微生物感染

[目的] 口蓋は咀嚼嚥下に働く重要な器官の一つである。イヌやウサギなどは体表の温度調節を行う放熱器官として働くため厚く緻密な血管構築を示す。ヒトやラットでは硬口蓋粘膜上に規則的な配列を示す薄い血管網が観察される。本研究では形態変化の少ないラット口蓋血管の機能を測定することで糖尿病や歯周疾患の微小循環との関連性を探ることは可能か検索を行った。

[方法] 本研究は神奈川県歯科大学実験動物指針に基づいて行われ、同動物倫理委員会の審査合格後に開始した。実験動物はWistar系ラットを用いた。対照群の他、歯周病モデルとして *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) 感染ラット、糖尿病モデルとして2型糖尿病モデル(GK)ラットを使用した。血管機能を測定するため口蓋粘膜を血流測定用プローブで1分間圧迫、解放後にみられる反応性充血をレーザードップラー血流計にて測定し血管弾性の指標とした。その後、形態学的観察を行うため実験動物の大動脈弓から合成樹脂を注入、周囲軟組織を溶解し血管鋳型標本とし走査型電子顕微鏡で観察をおこなった。

[結果と考察] 糖尿病モデルにおいて、歯肉循環調節機能は血管内皮および平滑筋機能抑制を介して経日的に低下した。この低下は *P.g* 感染によりさらに増大した。同様に歯槽骨吸収量は増加し、*P.g* 感染糖尿病モデルで有意に増大した。*P.g* 感染では歯槽骨にハウシッ窩が密集するのに対して、糖尿病ではフォルクマン管開口部が薄く拡大する異なった吸収像を示していた。また、腎糸球体において糖尿病モデルでは血管密度の減少が、*P.g* 感染糖尿病モデルではこれらに加え管腔の変性像が観察された。これらの結果は、口蓋血管の変化が全身の微小循環循環系と連動していることが示唆された。

[結論] 口蓋の血管機能から生体各部位の微細血管形態や微小循環動態を推測する事が可能であると考えられた。

[利益相反] 著者は利益相反がないことを宣言する。

Vascular structure and function of palatal microcirculation

○Matsuo M¹, Takahashi SS², Hamada N³

¹Div Dent Anat, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

²Div Circulation Control Dent, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

³Div Microbiol, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

Introduction: A palate plays the important role to the swallowing and masticatory function. The complications of diabetes are classified into angiopathy to occur in capillaries and large vessels. Periodontal disease is regarded as one of the complications of diabetes. In this study, microcirculation of diabetes and periodontal disease was examined from palatal vascular function.

Methods: Palatal blood flow was measured by Laser Doppler flowmetry in Wistar rats (W), periodontal disease (*P.g*) and diabetes model (GK). To evaluate vascular endothelial and smooth muscle functions, reactive hyperemia was elicited by release of occlusive palatal compression. To create the vascular resin cast model, Synthetic resin was perfused from the inferior alveolar arteries. These specimens were examined by Scanning Electron Microscope.

Results: Vascular resin casts of dense capillaries supporting the palatal epithelium. A rise in capillary network is in accordance with the arteriole of palatine arteries. Venous plexus is existed under the capillary layer. Reactive hyperemia in palatal circulation was decreased in W-*P.g*, GK, and GK-*P.g* compared to W. It was also decreased in GK-*P.g* compared to GK.

Conclusion: These results suggested that the reduction of endothelial function may occur in palatal tissue on both periodontal and diabetes models.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS5-4 スンクス口蓋のリンパ管構築

○安藤 禎紀¹, 畠山 慧², 藤村 朗¹

¹岩医大 歯 機能形態

²岩医大 歯 歯科矯正

我々は以前より齧歯目の頭頸部リンパ管構築を検索してきた。今回、我々は有胎盤哺乳類の原型を保持していると言われ、顎骨の形態が齧歯目よりヒトに近いと考えられる食虫目のスンクスを用いて、未だ不明確な口蓋の集合リンパ管の走行を検索することにした。

リンパ管の三次元再構築像から口蓋の骨膜上を前後方向に樹枝状に繋がりながら走行する集合リンパ管は第四小臼歯あるいは第一大臼歯付近に存在する左右一対の後口蓋孔へ入り込み、後口蓋管の中を走行し、口蓋後方に位置する翼口蓋窩へと到達していた。また後口蓋管の中で集合リンパ管は動脈を回り込むように内側から上方、外側へと位置を変えながら翼口蓋窩まで走行していた。これは口蓋からのリンパが深頸リンパ節に移行しやすいように後口蓋管の中で位置を変えたと考えられる。またスンクスとは違い、ヒトでは翼口蓋窩の位置が口蓋より上方にあり、リンパの流れが非効率的であると考えられるが、食虫目からヒトへの進化を考えた際にリンパ管の走行を再検討することにより合理性を見出すことが出来た。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Lymphatic architecture of *Suncus murinus* (House Musk shrew) palatum

○Ando Y¹, Hatakeyama S², Fujimura A¹

¹Div Func Mor, Dept Anat, Iwate Med Univ Sch Dent

²Div Orthodont, Dept Dev Oral Health Sci, Iwate Med Univ Sch Dent

The architecture of craniocervical lymphatic vessels in rodents has been examined previously. In the present study, we evaluated the distribution of collecting lymphatic vessels in the palate of *Suncus*, which is known to retain the prototype of placental mammals and are more similar to humans in terms of jaw bone morphology when compared with the rodents.

Three-dimensional reconstructed images of the *Suncus* palatum revealed that the collecting lymphatic vessels were connected to each other via smaller branches, and ran in an antero-posterior direction in the periosteum. The vessels entered the pair of posterior palatine foramina located near the fourth premolar or the first molar bilaterally, coursed through the posterior palatine canals, and reached the pterygopalatine fossa positioned posteriorly in the palate. The collecting lymphatic vessels changed directions from medial to superior to lateral while wrapping around arteries during their course, perhaps, to enable the smooth transition from the palate to the deep cervical node. Inefficient lymphatic flow in humans is attributed to the superior location of the pterygopalatine fossa in the palate when compared with its location in the *Suncus*. Considering the Evolution from Insectivora to humans during the evaluation of lymphatic architecture, a part of the reasons could be logically explained.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS6-1 歯の移動に伴う疼痛の経時的評価

○安達 一典¹, 須田 直人², 坂上 宏¹

¹明海大 歯 薬理

²明海大 歯 矯正

歯科疾患の多くは疼痛を伴うことから、その発生機序や治療方法に対する研究が精力的に行われ治療効果に結びついている。その一方で、患者に疼痛を与えざるを得ない矯正治療で生じる疼痛に関しては、発生や疼痛強度の経時的变化の機序について不明な点が多く存在し、その評価系も確立していない。そこで、ラットの上顎門歯と上顎右側臼歯をコイルスプリングで連結して矯正力を負荷する既存の矯正モデルを用いて、歯の移動に伴う疼痛の評価が可能であるかを、開口反射活性を主な指標として検討した。開口反射活性は、矯正力の負荷 1 日後に有意な上昇を認めたが、3 日後にはほぼ正常に戻り、7 日後には低下が認められた。歯の移動量ならびに多核破骨細胞の浸潤は、術後 1~3 日ではほとんど認められないが、いずれも 7 日後で有意な上昇を認めた。三叉神経節を GFAP 染色したところ、矯正力負荷 1 日後では右側の、7 日後では左側のサテライトグリア細胞活性が亢進していたことから、開口反射活性の経時的变化に関与している可能性が示唆された。矯正力負荷に由る開口反射活性の上昇は、アスピリン (100 mg/kg, × 3/day, ip) で有意に抑制されたが、同用量のアセトアミノフェンでは抑制されなかった。これらの結果は本モデルを用いることで、歯の移動に伴う疼痛を定量評価することが可能であり、疼痛発現に拘わる受容体機構や解剖学的変化などを検討することにも応用できることが示された。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Evaluation of temporal alteration of orthodontic pain

○Adachi K¹, Suda N², Sakagami H¹

¹Meikai Univ Sch Dent, Div Pharmacol

²Meikai Univ Sch Dent, Div Orthod

During orthodontic treatment, patients frequently suffer from the orthodontic pain, which lasts for a few days to a week after placement and/or activation of appliances. Unlike other dental disease-related pain, mechanism of orthodontic pain is still unclear and evaluation method for features of orthodontic pain (e.g., strength and temporal alteration) is not established. The aim of this study was to determine if orthodontic pain in classical animal model is able to be quantitatively evaluated by the excitability of jaw-opening reflex (JOR). Application of orthodontic force significantly increased JOR excitability in one day (D1) then decreased in seven days (D7). Excitation of satellite glial cells (SGCs) in trigeminal ganglion (TG) may play a role in temporal alteration of orthodontic pain because activated SGCs were observed in right TG at D1 whereas in left TG at D7. Administration of aspirin (100 mg/kg, × 3/day, ip) significantly reduced orthodontic pain-induced excitation of JOR activity, however, same dose of acetaminophen failed to effect. These results suggested that orthodontic pain is able to be evaluated by JOR excitability quantitatively. Moreover, detail of orthodontic pain (e.g., related-receptors and morphological alterations) are also be able to be investigated in this animal model.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS6-2 矯正力負荷によって生じる大脳皮質における興奮伝播の変化

○小林 真之

日大 歯 薬理

歯列矯正治療は、痛みを伴う歯科治療の1つであり、患者にとって大きな負担となっている。大脳皮質感覚野は、末梢における感覚情報を統合して認知に至る過程に重要な働きをしているが、歯根膜への刺激が大脳皮質においてどのような神経活動を引き起こすかについてはほとんど明らかになっていない。そこで我々は、ラット上下顎切歯・臼歯歯根膜に電気刺激を行い、大脳皮質への投射部位に局在性があることを光学計測法によって検討した。上下顎切歯・臼歯歯根膜の電気刺激に対する初期応答は、中大脳動脈の尾側の二次体性感覚野と島皮質にまたがる領域に位置しており、それぞれの初期応答には局在性が認められることが明らかになった。すなわち、上顎歯根膜応答領域に対して下顎歯根膜応答領域は尾側に位置していた。一方、最大応答の大部分は重複していた。さらに同様の手法を用いて、上顎臼歯に実験的矯正力を加えた矯正モデルラットと対照群における大脳皮質での神経活動を比較し、その経時的变化を検討した。その結果、矯正力負荷1日後のモデル動物では、対照群と比較して上顎臼歯刺激に対する応答の最大振幅と最大応答領域が有意に増大した。しかし3日後には応答が減少し、7日後には対照群と同程度まで回復することが明らかになった。これらの結果は、矯正力負荷によって大脳皮質感覚野の歯根膜刺激に対する応答は増大するものの、その応答性の増大は一時的であることを示唆している。現在、歯根膜への電気刺激ではなく機械刺激に対する皮質応答についても検討しているので、その知見を併せて紹介する。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Spatiotemporal properties of cortical excitation induced by periodontal stimulation in the model with experimental tooth movement

○Kobayashi M

Dept Pharm, Nihon Univ Sch Dent

The orthodontic force often causes uncomfortable sensations including nociception. However, it has remained unknown whether orthodontic treatment modulates cerebrocortical local circuits. We have performed *in vivo* optical imaging to identify the cortical responses evoked by electrical stimulation of the maxillary 1st molar periodontal ligaments (PDL) in rats. In controls, electrical stimulation of the PDL excited the rostroventral part of the primary somatosensory cortex (S1), the ventrocaudal part of the secondary somatosensory cortex (S2), and the insular oral region (IOR). The maximum responses to the PDL stimulation were observed both in S1 and S2/IOR, and most of these responses overlapped. One day after experimental tooth movement (ETM) of the maxillary 1st molar, the maximum response showed larger excitation in S2/IOR, though the initial responses were not affected. This facilitation of excitation gradually recovered to the control level 3-7 days after ETM. These findings suggest that ETM-induced facilitation of the cortical excitatory propagation responding to PDL stimulation one day after ETM recovers to the control level within a week.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS6-3 口腔粘膜の痛みと TRPV1 チャンネル

○城戸 瑞穂^{1,2}, 吉住 潤子³, 高尾 知佳², 吉本 怜子⁴, 大山 順子³, 合島怜央奈¹,
高岡 裕⁵, 豊福 明⁶

¹佐賀大 医 組織神経解剖

²九大 院歯 分子口腔解剖

³九大 顔面口腔外科

⁴九大 院歯 歯周病

⁵神戸大 院医

⁶医科歯科大 院歯 歯科心身医学

口腔粘膜は鋭敏な感覚を備えており、飲食物の性状や、その中に含まれる毒物や刺激物などを選別することができる。口腔の鋭敏な感覚が損なわれても過敏でも QOL に大きく関わる。舌痛症あるいは口腔内灼熱症候群 (burning mouth syndrome, BMS) は、口腔粘膜における痛みや異常感覚を長期に訴える。臨床的に明らかな原因疾患が認められず、その訴えが非定型的でその痛みの機構や治療法が不明であるにもかかわらず患者の増加も報告されていることから、BMS の機序の解明は歯科診療現場の重要な課題の一つである。患者の多くは、ヒリヒリ、ピリピリした痛みを訴え、さらに熱いもので増悪するという。私たちは、これらの訴えが唐辛子など辛いものを食したときの感覚と類似していることに着目し、唐辛子の辛味成分であるカプサイシンの受容体であるイオンチャンネル transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の関与を調べることにした。

ヒト口腔粘膜における TRP チャンネルの発現を調べ、口唇、頬、口蓋の粘膜に TRP チャンネル群が発現していることを確認した。さらに、461 名の正常被験者および 113 名の BMS 患者よりゲノムを採取し、TRPV1 の single nucleotide polymorphism (SNP) および、痛み症候との関連を検討した。TRPV1 のチャンネル開口部に近接した SNP と痛み症候とに統計的な有意差を見いだしたことから、BMS の痛みには TRPV1 が関与することが示唆された。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Oral pain and TRPV1 channel

○Kido M^{1,2}, Yoshizumi J³, Takao T², Yoshimoto R⁴, Ohyama Y³, Aijima R¹, Takaoka Y⁵,
Toyofuku A⁶

¹Sect Anat Physiol, Saga Med Sch

²Mol Cell Biol Oral Anat, Grad Sch Dent, Kyushu Univ

³Sect Oral Maxillofacial Surg, Kyushu Univ

⁴Sect Periodont, Grad Sch Dent, Kyushu Univ

⁵Dev Med Infomatics Bioinformatics, Kobe Univ

⁶Psychosomatic Dent, Grad Sch Tokyo Med Dent Univ

Oral mucosa has sensitive perception systems, which enable us to select and discriminate palatable and/or harmful substances in food and drink. The sensitivity is closely associated with the quality of our life. Burning mouth syndrome (BMS) is an idiopathic condition characterized by a continuous burning sensation of the mucosa of the mouth, typically involving the tongue, lips, gingiva and palatal mucosa. Although the patients complain continuous pain and uncomfortable sensation, the pathophysiology of BMS remains to be elucidated. It is well known that the burning or tingling sensation is evoked by capsaicin, an ingredient of hot chilli pepper. We focused here the relationship between BMS pain and transient receptor potential channel (TRPV1), capsaicin receptor, since the burning pain sensation appeal of BMS is similar to the feeling evoked by hot chilli pepper, and the pain is aggravated by hot food or drink intake. We found thermosensitive TRP channels in human oral mucosa. We explored the single nucleotide polymorphism of TRPV1 in 461 normal subjects and 113 BMS patients. As we found significant difference between TRPV1 SNP and frequency of BMS, TRPV1 may be one of the targets to resolve BMS pathophysiology.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS7-1 Type IX secretion system and gliding motility in Bacteroidetes phylum bacteria

○Koji Nakayama

Div Microbiol Oral Infect, Dept Mol Microbiol Immunol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Porphyromonas gingivalis is a Gram-negative anaerobic bacterium, which is implicated to be a major pathogen for periodontal disease. A novel secretion system, the Por secretion system, which is now referred to as the type IX secretion system (T9SS), has been found in the study of gingipains secretion. In addition to gingipains, a number of *P. gingivalis* proteins including the metallocarboxypeptidase CPG70, the 35-kDa hemin-binding protein, the peptidylarginine deiminase PAD, and the Lys-specific serine endopeptidase PepK are secreted by the T9SS.

P. gingivalis T9SS consists of at least 11 component proteins, however, the regulatory mechanism of their expression has not yet been elucidated. Recently, we found that the PorY-PorX-SigP cascade is involved in the regulation of T9SS. Surface plasmon resonance (SPR) analysis revealed a direct interaction between a recombinant PorY (rPorY) and a recombinant PorX (rPorX). rPorY autophosphorylated and transferred a phosphoryl group to rPorX in the presence of Mn²⁺. These results demonstrate that PorX and PorY act as a response regulator and a histidine kinase, respectively, of a two component system (TCS), although they are separately encoded on the chromosome. T9SS component-encoding genes were down-regulated in a mutant deficient in a putative extracytoplasmic function (ECF) sigma factor, SigP, similar to the *porX* mutant. Electrophoretic gel shift assays showed that rSigP bound to the putative promoter regions of T9SS component-encoding genes. The SigP protein was decreased in the *porX* mutant. Co-immunoprecipitation and SPR analysis revealed the direct interaction between SigP and PorX. Together, these results indicate that the PorXY TCS regulates T9SS-mediated protein secretion via the SigP ECF sigma factor.

Like *P. gingivalis*, many oral bacteria, which are linked to periodontal disease, belong to the phylum Bacteroidetes. These bacteria are involved in the genera *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella* and *Capnocytophaga*, and possess T9SS-related genes in their genomes. We found with mutant study that *Tannerella forsythia* and *Prevotella intermedia* have functional T9SSs. T9SSs are not limited to the oral bacteria but extend to other bacteria belonging to the phylum Bacteroidetes such as *Flavobacterium johnsoniae* and *Cytophaga hutchinsonii* known as gliding bacteria. Gliding motility of the bacteria is tightly associated with T9SS. We propose a helical loop track model for gliding motility of Bacteroidetes phylum bacteria.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS7-2 The role of *Porphyromonas gingivalis* hydrogen sulfide in mouse inflammation

○Koki Shioya

Dept Oral Microbiol, Matsumoto Dent Univ

Porphyromonas gingivalis is a major pathogenic bacterium of periodontitis and produces various virulence factors including LPS and gingipain. In addition, *P. gingivalis* also produces a gas molecule, hydrogen sulfide (H₂S). H₂S is considered to be the third gasotransmitter followed by nitrogen oxide and carbon monoxide and it plays a vital role in physiological and pathological processes. In oral cavity, H₂S is correlated with the severity of periodontitis. However, the H₂S synthase in *P. gingivalis* and the effect of H₂S on inflammation remain unclear. Recently, we have identified the H₂S synthase from a disrupted *P. gingivalis* W83 cell suspension and demonstrated that the H₂S synthase-deficient strain of W83 (KO strain) did not produce H₂S. These results suggest that this enzyme is the only H₂S synthase in *P. gingivalis*. To investigate the effect of this enzyme on mouse inflammation, *P. gingivalis* WT and KO strains were subcutaneously injected into the backs of mice, and levels of inflammation and mortality were monitored daily. The mean diameter of the abscesses formed following infection of the KO strain was smaller than that of the WT strain. Although the infection by WT strain led to death of all mice, all the mice infected by KO strain were alive for 6 days after infection. These data supports the notion that H₂S produced by *P. gingivalis* affects the degree of inflammation.

Conflict of Interest: The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

SS7-3 Epidemiology and transmission of *Porphyromonas gulae* among dogs and owners

○Haruka Sasaki, Kiyoko Watanabe, Nobushiro Hamada

Div Microbiol, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ

Objective : *Porphyromonas gulae* is a black-pigmented anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. *P. gulae* is often isolated from the gingival sulcus of various animals including dogs and cats. In this study, we investigated the distribution of *P. gulae* in dogs and their owners using oral specimens subjected to a molecular biological method to investigate the possibility of dog-owner transmission of *P. gulae*. Methods: Dental plaque specimens from the dogs and their owners were collected from the gingival margin of the buccal side of the maxillary molar region using sterile cotton swabs. A 16S rRNA-based PCR detection method was used to determine the distribution of *P. gulae*. Results: *P. gulae* was detected from dental plaque specimens of three owners by *P. gulae* species specific primers. *P. gulae* ATCC 51700 adhered to human gingival fibroblast cells as well as *P. gingivalis* ATCC 33277. Conclusion : *P. gulae* could be transmitted humans from their dogs. *P. gulae* positive dog may act as a source of infection for human. These findings suggest that binding sites involved in the interaction with the human host cell present in *P. gulae*. **Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS7-4 Structural and mechanistic insights into a distinct type of pilus

○Mikio Shoji¹, Qingping Xu², Satoshi Shibata¹, Mariko Naito¹, Keiko Sato¹, Ian A Wilson³, Koji Nakayama¹

¹Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, Dept Microbiol Oral Infect

²Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, SLAC National Accelerator Laboratory, USA

³The Scripps Research Institute, USA

Bacterial pili are known to be adhesion molecules and one of virulence factors. It has been reported that so far there are three different types of pili (fimbriae) such as type I pili, type IV pili and Curli, due to their own biogenesis mechanisms. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* has two different pili called Fim and Mfa pili, and the gut pathogen *Bacteroides fragilis* also produces pili. We have reported that major structural components FimA and Mfa1 of *P. gingivalis* pili are transported to the outer membrane as lipoproteins and are polymerized after cleavage of the N-terminal region of their proteins by Arg-gingipain. However, the exact biogenesis mechanism of their pili has not been determined. We analyzed crystal structures of 20 FimA-related proteins and performed biochemical analyses including Cys-Cys cross-linking and palmitic acid labeling. Crystal structures revealed a diverse protein superfamily with a Greek-key β -sandwich fold with two transthyretin (IgG inverse)-like repeats that polymerize into pilus through a strand-exchange mechanism. The assembly mechanism of the central, structural pilins involves proteinase-assisted removal of their N-terminal β -strand, creating an extended hydrophobic groove that binds the C-terminal donor strands of the incoming pilin. Anchor proteins function as lipoproteins and terminate the assembly. As these structures and the biogenesis mechanism are not similar to other three types of pili, we propose that *P. gingivalis* pili have a novel biogenesis mechanism that is distinct from other bacterial pili.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS7-5 Osteoimmunology in periodontal disease

○Masayuki Tsukasaki¹, Noriko Komatsu¹, Tomoki Nakashima², Hiroshi Takayanagi¹

¹Dept Immunol, Grad Sch Med Fac Med, The Univ Tokyo

²Dept Cell Signal, Grad Sch Med Dent Sci, Tokyo Med Dent Univ

Osteoimmunology is an interdisciplinary research field that investigates the interaction of the immune and skeletal systems. Osteoimmunology has been developed through the study of the immune regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis (RA) research, and has contributed significantly to the understanding of joint destruction in RA. However, the precise mechanisms underlying bone destruction associated with other inflammatory diseases, such as periodontal disease (PD) remain largely unclear. Thus, a conceptual application of osteoimmunology to PD research will provide key insights into the pathogenesis of PD, and help develop new therapeutic strategies to regulate the osteo-immune system in PD-induced bone loss.

To date, accumulated evidence has shown that CD4⁺ T cells play a key role in the pathogenesis of inflammatory bone diseases. Foxp3-expressing regulatory T (Treg) cells and IL-17-producing (Th17) cells are CD4⁺ T cell subsets, which have opposite roles in inflammatory bone destruction. Th17 cells are the exclusive T cell subset that promotes osteoclastogenesis via increasing local RANKL levels, while Treg cells have a protective role in inflammatory bone loss via immune-suppressive functions that depend on Foxp3 gene expression. Recently, we found that Foxp3⁺ T cells were converted to Th17 cells (exFoxp3Th17 cells) under arthritic conditions. These exFoxp3Th17 cells expressed a high amount of RANKL and were shown to be the most pathogenic T cell subset in arthritis-induced bone destruction. Since IL-17⁺ Foxp3⁺ T cells, which may represent a transition state during the conversion, were observed in human periodontal lesions, we hypothesized that exFoxp3Th17 cells might contribute to the bone loss in PD. Here we would like to discuss the pathogenic role of exFoxp3Th17 cells in PD-induced bone loss, and describe the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of PD in the context of osteoimmunology.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS8-1 活性パースルフィドによるレドックス制御の分子基盤

○赤池 孝章

東北大 院医 環境保健医学

近年, L-システイン (Cys) のチオール基に過剰にイオウ分子が付加したシステインパースルフィド (CysSSH) やグルタチオンパースルフィド (GSSH) などの活性イオウ分子種 (reactive sulfur species, RSS) の高いレベルの生体内生成が明らかとなった. CysSSH や GSSH は, チオール基の pKa が顕著に低下し, 求核性において反応性が高まった生理的なイオウ代謝物である. また, 生体内にはパースルフィドの大きなプールがあり, その代謝経路に由来する RSS が, 抗酸化・レドックスシグナルを司ることも示唆されている. さらに, RSS はタンパク質中の Cys 側鎖中にも大量に存在していることが分かっており, このタンパク質ポリサルファー化 (protein polysulfuration) は, RSS のシグナル伝達を担う分子基盤である. 一方, 最近, ポリサルファー化タンパク質が生物種普遍的に発現しており, CysSSH の翻訳時取込により形成されることが明らかとなった. この画期的な発見により, 今後, RSS による抗酸化・レドックスシグナル制御機構の解明とレドックスバイオロジーの革新的な展開が期待される. すなわち, RSS による抗酸化応答, 解毒代謝, レドックスシグナル制御の解明は, 酸化ストレスの関わる, 感染・炎症, がん, 国民病である動脈硬化症・メタボリックシンドロームなどの生活習慣病, アルツハイマー病などの神経変性疾患などの新規診断法, 予防・治療法の確立に大きく貢献するであろう.

【利益相反】 開示すべき利益相反はない.

Molecular basis of redox regulation for reactive persulfides

○Akaike T

Dept Environ Health Sci Mol Toxicol, Tohoku Univ Grad Sch Med

Cysteine persulfide is known to be a physiological metabolite formed ubiquitously in various organisms. We recently identified appreciable generation of cysteine persulfide in cultured cells and in vivo. These reactive sulfur species like persulfides and related species (e.g., hydropolysulfides) were potent scavengers for reactive oxygen species and showed a strong redox signaling regulatory function via electrophile thiolation. The best example is a chemical and biological interaction of persulfide species with the endogenously generated electrophile 8-nitro-cGMP. The biological relevance of cysteine persulfides/polysulfides is now increasingly recognized as essential structural residues or prosthetic components of many proteins and enzymes, which may include metal ligands most typically observed with iron sulfur clusters. Surprisingly, a clear translation-coupled cysteine polysulfuration is revealed herein and its incorporation into proteins ubiquitously occurs among different organisms. Clarification of molecular mechanisms of biosynthesis and physiological functions of polysulfur proteins may potentially promote a paradigm shift of molecular and chemical biology, opening up to a new era of innovation in the redox biology.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest.

SS8-2 Nrf2 と eIF2 α -ATF4 ストレス応答経路のクロストークによるレドックス応答機構

○伊東 健

弘前大 院医 分子生体防御

Nrf2 は化学発がんの分野から見出された転写因子であり、親電子性物質により活性化して解毒化酵素を誘導、発がん物質を解毒化して発がんを抑制する。生理的にも、Nrf2 は親電子性物質をはじめとする外因性および内因性の反応性化学物質を解毒化して健康に寄与している。また、Nrf2 は解毒化酵素ばかりではなく、グルタチオンや NADPH 合成の律速酵素やヘムオキシゲナーゼ 1 などの抗酸化タンパク質をはじめとする多くの遺伝子の発現を制御する。我々は以前に COX-2-PGD 合成経路を介したシクロペンテン系の親電子性プロスタグランジン 15d-PGJ₂ の生成が血管擦り応力による Nrf2 の活性化に関与することを示した。また、COX-2-PGD 合成経路を介した 15d-PGJ₂ によるマクロファージ Nrf2 の活性化がカラゲニン誘導性の肺炎や胸膜炎による炎症の抑制にも関与することを示した。一方、がん細胞は活性酸素を多量に産生するため酸化ストレスに曝される。これが本来であれば細胞の増殖や転移を抑制するが、がん細胞体細胞変異による Nrf2 の活性化は、活性酸素を解毒化してがんの悪性化に寄与していることも近年明らかになっている。

ATF4 は Nrf2 と同じロイシンジッパー構造を持つ転写因子であるが、種々のストレスにより eIF2 α のリン酸化を介して活性化される。我々は Nrf2 と ATF4 が物理的に相互作用して標的遺伝子上で複合体を作り、シスチントランスポーターを始めとする多くの遺伝子の発現に関与することを明らかにした。

本講演では Nrf2 と eIF2 α のリン酸化経路とのクロストークを中心に研究成果を紹介しつつ、最新の Nrf2 研究の動向も紹介する。

【利益相反】 利益相反状態にありません。

Redox cross talk regulation between Nrf2 and eIF2 α -ATF4 pathway

○Itoh K

Dept Stress Response Sci, Hirosaki Univ Grad Sch Med

Basic leucine zipper transcription factor Nrf2 was originally found in the field of cancer chemoprevention research where Nrf2 is activated by phenolic antioxidants to regulate the expression of a battery of carcinogen detoxifying enzyme genes such as glutathione S-transferases via antioxidant responsive element (ARE). Nrf2 also regulates numerous oxidative stress-inducible genes such as HO-1 and NQO1 to combat with both environmentally and endogenously generated oxidative stress. We previously found that Nrf2 is activated in human endothelial cells by electrophilic prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) generated via COX-2-PGD synthase pathway in response to laminar shear stress. Nrf2 activation in macrophages by 15d-PGJ₂ via COX-2-PGD synthase pathway also ameliorates carrageenan-induced pleurisy.

ATF4 is translationally activated by various stresses such as amino acid deficiency and viral infection through eIF2 α phosphorylation. We recently demonstrated that ATF4 and Nrf2 physically interact and cooperatively regulate the inducible expression of cystine transporter (xCT) gene after proteasome inhibition. Furthermore, carnosic acid, a major constituent of the herb rosemary, activates both ATF4 and Nrf2 to synergistically regulate genes such as NGF and HO-1. Therefore, we propose that ATF4 is a transcriptional partner and a potential pharmacological target in considering Nrf2 targeted therapeutics.

Conflict of Interest: I have no conflict of interest.

SS8-3 レドックスバイオロジーと歯科疾患 —レドックスバランス変調による血管病としての歯周病—

○李 昌一

神歯大 横須賀・湘南・災害医療歯科研究セ

レドックスバイオロジーの主役である活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) による酸化ストレス (Oxidative Stress) は生体分子の酸化, とくに生体膜の脂質過酸化反応による損傷, 蛋白質および核酸の変性などの原因であり, 糖尿病, 動脈硬化, 高血圧症などの生活習慣病だけではなく認知症に代表される神経変性疾患メカニズムの原因としても知られている. 同様に生活習慣病でもある歯周病の発症メカニズムにも酸化ストレスが関与していると言われているが, その酸化ストレスの面からの詳細な疾患メカニズムの解明による臨床応用の実現にまでは至っていない. 21世紀に入って, 全身疾患と歯周病との新しい相関概念としてペリオドンタルメディスン (periodontal medicine; 歯周病医学) という考えが米国から提示された. 糖尿病および動脈硬化などの循環疾患において先に述べたように酸化ストレスが主要な原因であるのに, これまでの歯周病発症メカニズムは歯周病原細菌を主たる原因とした炎症による感染症であるという考え方が今も主流である. 歯周病は, 感染症だけではなく, 酸化ストレスも関与する疾患であり, ペリオドンタルメディスンという概念を考えるには, 歯周病が歯周病原細菌による感染症だけではなく, 糖尿病, 動脈硬化同様の酸化ストレスによる「血管病」としての歯周病への認識が今後歯周病治療の臨床応用に重要になることを期して, レドックスバランスの変調による酸化ストレスの歯周病への関与について概説したい.

【利益相反】 今回の演題に関連して, 開示すべき利益相反状態はありません.

Redox biology and dental disease —Periodontitis as vascular disease by alteration of redox balance—

○Lee M

Yokosuka · Shonan · Disaster Health Emerg Res Center, Kanagawa Dent Univ

Oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS), which was critical mediator in the redox biology, is thought to play a role in the pathogenesis, in particular, caused by lipid peroxidation of biological membranes. Oxidative stress could be involved in various disease, including not only lifestyle-related diseases such as arteriosclerosis, hypertension and diabetes but also neurodegenerative disease such as dementia. Periodontitis are also known to be associated with oxidative stress, which is the same in lifestyle-related diseases. It would not be development of clinical application from the aspect of oxidative stress since their mechanism of disease could not be understood, in detail. It was well known that a main cause of periodontitis by infection of bacterial periodontal pathogens, although oxidative stress could be key mediator in of arteriosclerosis, and diabetes as described above. To think the concept of periodontal medicine, periodontitis would be not only infectious diseases caused by periodontal pathogenic bacteria, but also “vascular disease” such as arteriosclerosis and diabetes caused by damage of the arteries by oxidative stress. These recognition will be important in clinical applications of treatment on periodontitis in the future. Thus, we want an overview of the involvement with the periodontitis on oxidative stress by alteration of redox balance.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS8-4 8-ニトロ-cGMP は新しい骨伸長因子である

○宮本 洋一

昭大 歯 口腔生化

骨の伸長は、骨端成長板における軟骨細胞の増殖と分化によって制御される。軟骨細胞の増殖に一酸化窒素(NO)の関与が示唆されているが、詳細は不明である。最近、NOと活性酸素の産生下に生成する8-ニトロ-cGMPが新しい細胞内シグナル分子として同定された(Nat Chem Biol 3: 727-35, 2007)。8-ニトロ-cGMPは、その親電子的性質によりタンパク質のシステイン残基をS-グアニル化し、様々な組織で細胞の増殖、分化、機能を調節することが報告されている。しかし、軟骨における8-ニトロ-cGMPの生成あるいは機能は明らかにされていない。一方、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)はcGMPを介して軟骨細胞の増殖と肥大化分化を促進する。そこで我々は、軟骨におけるCNPの生物活性の発現における8-ニトロ-cGMPの役割を解析した。胎生16.5日のマウス脛骨の器官培養系に、NO合成酵素(NOS)阻害剤存在下および非存在下にCNPを添加したところ、CNPは成長板における8-ニトロ-cGMPの生成と成長板および脛骨の伸長を促進したが、NOS阻害剤はこれらを阻害した。また、マウス初代培養軟骨細胞をCNPで刺激したところ、NOS活性に依存した8-ニトロ-cGMPの生成と細胞増殖の促進が認められた。さらに、化学合成8-ニトロ-cGMPは、器官培養下の脛骨成長板の伸長およびマウス初代培養軟骨細胞の増殖を促進した。一方、8-ニトロ-cGMPは、軟骨細胞における肥大化マーカーの発現には影響を与えなかった。以上より、8-ニトロ-cGMPは、成長板軟骨細胞の増殖を促進する、新たな内因性シグナル分子と考えられた。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

8-Nitro-cGMP is a novel bone expansion factor

○Miyamoto Y

Dept Biochem, Showa Univ Sch Dent

Expansion of bones depends on longitudinal growth of the growth plates that is strictly regulated by growth and differentiation of chondrocytes in the growth plates. While it is known that nitric oxide (NO) participates in the proliferation of chondrocytes, the precise mechanism has not been clarified. On the other hand, C-type natriuretic peptide (CNP), which uses cGMP as a second messenger, is another positive regulator of growth plate expansion. Recently, 8-nitro-cGMP was newly identified as a signaling molecule produced by guanylate cyclases from 8-nitro-GTP formed in the presence of NO, reactive oxygen species, and GTP. Here, we found that 8-nitro-cGMP is produced in growth plate chondrocytes, and enhances growth plate expansion and chondrocyte proliferation, suggesting its involvement in the expansion of bones. Our observations indicate that the effects of NO and CNP on the growth plates is explained by the activity of 8-nitro-cGMP.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS9-1 歯周病菌感染による脳内アルツハイマー様病態の誘発メカニズム

○武 洲^{1,2}, 中西 博¹¹九大 院歯 口腔機能分子科学²九大 院歯 OBT 研究セ

近年、死亡したアルツハイマー型認知症患者の脳から歯周病菌である P.ジンジバリス (Pg 菌) 由来 LPS が検出され、歯周病はアルツハイマー病の増悪因子として注目を集めている。しかし、この連関の詳細な機序については不明な点が多い。アルツハイマー病の発症・進行にはアミロイド β ($A\beta$) のニューロン内蓄積に起因するリン酸化タウタンパクの過剰な蓄積ならびに神経変性・細胞死へと至る $A\beta$ カスケードが中心的役割を果たしている。また、ミクログリアに依存する脳炎症がアルツハイマー病の進行に関与し、全身炎症により増悪することが知られている。私たちは「歯周病菌感染はミクログリアの活性化を介して脳内アルツハイマー病態を誘発/増悪する」という仮説を立て、Pg 菌経口感染あるいは Pg 菌 LPS 末梢投与により引き起こされるミクログリアの活性化メカニズム、 $A\beta$ のニューロン内蓄積メカニズムならびに学習・記憶障害メカニズムについて検討を進めている。これまでの一連の研究により、Pg 菌経口感染あるいは Pg 菌 LPS 末梢投与は中年マウスにおいて、TLR2 ならびにカテプシン B 依存的にミクログリアを活性化し、ニューロン内 $A\beta$ 蓄積を誘導することを明らかにした。興味深いことに、Pg 菌経口感染した中年マウスでは学習・記憶障害が Pg 菌 LPS 末梢投与の場合より早期から認められた。これらのことから、歯周病の予防・治療は歯源性菌血症を防ぐことにより、アルツハイマー病の予防にもつながることが示唆される。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

The novel mechanism underlying Alzheimer's disease-like neuropathology and cognitive deficits following *Porphyromonas gingivalis* periodontal infection

○Wu Z^{1,2}, Nakanishi H¹¹Sect Aging Sci Pharmacol, ²OBT Res Center, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Recently, much attention has been paid to periodontitis as an exacerbating factor of Alzheimer's disease (AD), because LPS derived from *Porphyromonas gingivalis* (Pg) was detected in the brain of AD patients. However, the precise mechanism underlying their associations remains to be clarified. Amyloid β ($A\beta$) cascade, which induces $A\beta$ accumulation, tau hyperphosphorylation and neuronal degeneration and cell death, plays a central role in the onset and progression of AD. Moreover, microglia-mediated neuroinflammation is also involved in the progression of AD. We hypothesize that Pg periodontal infection induces and promotes the pathologies of AD through activation of microglia. We have attempted to clarify the precise mechanism of microglia activation, the neuronal accumulation of $A\beta$ and the learning and memory impairment following chronic Pg periodontal infection or chronic systemic PgLPS treatment in middle-aged mice. We have found that chronic Pg periodontal infection or chronic systemic PgLPS treatment induces TLR2 and cathepsin B-dependent microglia activation, which in turn causes the neuronal accumulation of $A\beta$ in the hippocampus of middle-aged mice. Interestingly, the mean onset of the learning and memory impairment following chronic Pg periodontal infection was significantly earlier than that following chronic systemic PgLPS treatment. Therefore, prevention and treatment of periodontitis restrains the tooth source bacteremia, leading to prevention and treatment of AD.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS9-2 島皮質オシレーションと味覚-摂食機能連関

○豊田 博紀¹, 佐藤 元¹, 齋藤 充², 姜 英男¹

¹阪大 院歯 口腔生理

²鹿大 院医歯 口腔生理

ラット大脳皮質第一次味覚野（島皮質）では、吻側に味覚野が位置し、その尾側に内臓（胃腸、呼吸器、心臓）の感覚運動を統合する自律機能関連領野が位置している。両領野が隣接して存在しているため、味覚認知により自律機能関連領野の神経活動が影響を受け、摂食行動の制御に関わっている可能性が示唆される。しかしながら、その神経機構については不明な点が多い。そこで本研究では、島皮質に発現している TRPV1 および CB1 受容体に着目し、これらの受容体を活性化した際、島皮質味覚野と自律機能関連領野との間に神経活動の協調が生じるか否かを膜電位測光法を用いて検討した。島皮質を含むスライス標本に TRPV1 受容体のアゴニストであるカプサイシンを灌流投与したところ、島皮質味覚野と自律機能関連領野間にシータリズムの周期的同期化活動が認められた。こうした神経活動は、カプサイシンを含むスパイシーな食品を摂取した際に生じる食欲亢進および自律神経反応に関与している可能性が示唆される。また、島皮質を含むスライス標本に CB1 受容体のアゴニストであるアナンダミドを灌流投与したところ、味覚野に 5 Hz の周期的同期化活動が生じ、その個々の興奮波は胃腸自律領野に伝播していた。空腹時、脳神経細胞においてアナンダミドの産生が増加し、摂食行動が促進されることが知られている。また、空腹時、味覚野と胃腸自律領野の神経活動が上昇することが知られている。このため、アナンダミドにより生じる島皮質味覚野と胃腸自律領野間の神経活動協調は、空腹時における摂食亢進の神経機構の一つである可能性が示唆される。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

The oscillation in the insular cortex implicated in taste-dependent feeding behavior

○Toyoda H¹, Sato H¹, Saito M², Kang Y¹

¹Dept Neurosci Oral Physiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Dept Oral Physiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Higher brain functions such as perception or cognition are thought to be mediated by oscillatory synchronization of firing activities of pyramidal neurons located within a single column or across different columns of the cerebral cortex. Oscillations recorded from different brain regions become synchronized to form a large-scale network for the integration of distributed brain function. We found that TRPV1 activation by capsaicin in the gustatory insula (Gu-I) induces 4-8 Hz synchronization widely across columns, between the Gu-I and autonomic insula (Au-I). Such neural synchronization is implicated in autonomic responses to tasting and ingesting spicy foods. We also found using voltage-sensitive dye live imaging that anandamide induces theta-rhythm oscillatory synchronization in the Gu-I which propagates along the supragranular layer into the gastrointestinal autonomic insula (GI-Au-I), displaying a large scale oscillatory coordination between the two cortical regions; Gu-I and GI-Au-I. Such neural coordination is implicated in the feeding behavior based on taste recognition. Our results provide a new insight into the higher-order brain mechanism for the cortical integration between the two different cortical areas which would be involved in the emotional feeding behavior caused by taste recognition.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS9-3 味覚調節系と肥満によるその変化

○吉田 竜介^{1,2}¹九大 院歯 口腔機能解析²九大 OBT 研究セ

味覚は動物の摂食行動に大きな影響を持つ。中でも甘味は糖により引き起こされる感覚で、飲食物中に含まれるエネルギー源を検知する役割を持つ。これまでの研究で、甘味感受性は摂食抑制ホルモンであるレプチンにより抑制され、摂食促進に働く内因性カンナビノイドにより増強されることが明らかとなってきた。レプチンの甘味抑制効果はレプチン受容体変異マウス (*db/db* マウス) では効果が見られず、レプチン受容体は味蕾内で甘味受容体コンポーネント T1R3 と共発現した。また甘味受容細胞の味応答はレプチンにより抑制され、さらにレプチン受容体アンタゴニストや ATP 感受性 K チャネル (K_{ATP} チャネル) 阻害剤 (glibenclamide) によりその抑制効果は阻害された。これらは、レプチンが味蕾内でレプチン受容体を発現する甘味受容細胞に働きかけ、 K_{ATP} チャネルを活性化することにより味応答を抑制することを示す。一方、内因性カンナビノイドの甘味増強効果はカンナビノイド受容体 (CB_1) ノックアウトマウスで見られず、味蕾内で CB_1 は T1R3 と共発現した。甘味受容細胞の味応答は内因性カンナビノイドで増強され、 CB_1 阻害剤 (AM251) でその効果が消失した。これらは、内因性カンナビノイドが CB_1 を発現する甘味受容細胞に働き味応答を増大させることを示す。高脂肪食により肥満誘導したマウス (DIO マウス) を用い、肥満による甘味調節系の機能変化について調べると、通常食を与えた非肥満マウスでは甘味感受性は主にレプチンにより調節され、DIO マウスでは内因性カンナビノイドが主に甘味感受性を調節していることが明らかとなった。このように、甘味調節系は肥満の進行によりレプチン系からカンナビノイド系にシフトしていくと考えられる。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Modulation of taste sensitivity by orexigenic and anorexigenic factors: Effect of obesity

○Yoshida R^{1,2}¹Sec Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ²OBT Res Center, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

Gustatory responses to sweet substances are modulated by leptin, an anorexigenic hormone, and endocannabinoids, orexigenic mediators. Leptin suppressed sweet taste responses of T1R3-expressing taste cells and leptin receptor was coexpressed with T1R3 in taste cells. Leptin's effect was not observed in leptin receptor deficient *db/db* mice and was inhibited by ATP sensitive K channel (K_{ATP} channel) blocker glibenclamide. These results suggest that sweet suppressive effect of leptin is mediated by leptin receptor and K_{ATP} channels expressed in T1R3-positive taste cells. Endocannabinoids enhanced sweet taste responses of T1R3-expressing taste cells. This effect was inhibited by cannabinoid receptor (CB_1) blocker (AM251) and was not observed in CB_1 -knockout mice. CB_1 was coexpressed with T1R3 in taste cells. Thus sweet enhancing effect of endocannabinoids is mediated by CB_1 expressed in T1R3-positive taste cells. By using diet-induced obese (DIO) mice, the effect of obesity on functions of sweet modulatory systems was investigated. In control mice which fed normal chow, the dominant modulator for sweet taste was leptin. In contrast, endocannabinoids became dominant modulators for sweet taste in DIO mice. Thus obesity may cause the shift of dominant sweet-modulatory system from leptin to endocannabinoids.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS9-4 口腔顔面に発症する異所性痛覚過敏の末梢神経機構

○篠田 雅路, 梶 佳織, 本田 訓也, 杉山 朋久, 岩田 幸一
日大 歯 生理

口腔顔面領域の末梢神経損傷が原因で、健全な部位に異常疼痛を訴える症例に時折遭遇する。一般に、このような異所性異常疼痛は異なる領域から延髄や脊髄の一次侵害受容ニューロンへの収束に起因する（収束説）と考えられている。しかし、三叉神経脊髄路核尾側亜核における顎顔面口腔領域を支配する三叉神経各枝からの投射は収束が少なく、顎顔面口腔領域における異所性疼痛の発症機構を収束説だけで説明するのは非常に難しい。最近の研究から、顎顔面口腔領域を支配する感覚神経の細胞体およびグリア細胞が存在する三叉神経節内で、さまざまな情報伝達が行われ、一次侵害受容ニューロンの興奮性調節に関与していることがわかってきた。我々は、下歯槽神経切断後に口髭部皮膚において機械アロディニアが発症し nNOS 陽性を示すオトガイ部皮膚投射三叉神経節ニューロン数が増加すること、下歯槽神経切断後に三叉神経節内へ、選択的 nNOS 阻害薬を持続投与することにより口髭部皮膚の機械アロディニアが抑制されること、無処置ラットへの三叉神経節内への一酸化窒素の基質である L-arginine 持続投与により機械アロディニアが発症することを見出した。さらに下歯槽神経切断後、三叉神経節の三叉神経第Ⅱ枝領域において小型ニューロン周囲の衛星細胞が活性化し、選択的ギャップ結合阻害薬または衛星細胞活性阻害薬の三叉神経節内持続投与により、口髭部皮膚の機械アロディニアが抑制されることがわかった。これらの結果から、下歯槽神経損傷による三叉神経節内の NO 産生増加やギャップ結合を介した衛星細胞活性化の伝播が三叉神経第Ⅱ枝領域投射ニューロンの活性化を引き起こし、異所性痛覚過敏が発症すると考えられる。本シンポジウムでは、三叉神経節内の情報伝達機構についてわれわれの研究結果を中心に最新の報告も交え、口腔顔面に発症する異所性痛覚過敏の末梢神経機構について議論する。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Peripheral neural mechanisms underlying ectopic orofacial pain

○Shinoda M, Kaji K, Honda K, Sugiyama T, Iwata K
Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

It is well known that injury of trigeminal nerve fibers induces persistent ectopic pain which can spread to a wide area of the orofacial region innervated by the uninjured trigeminal nerve branches. Generally, convergent-projection is proposed as the biological mechanism of ectopic pain. However, it's hard to understand the underlying pathophysiology regarding ectopic orofacial pain, because the convergent-projection of primary afferents from different orofacial regions is few in the medulla. Recently, some studies indicated that intra-trigeminal ganglion (TG) signaling plays a major role in the modulation of trigeminal nociceptive processes. In our studies, inferior alveolar nerve injury induces persistent ectopic pain which spreads to a wide area in the orofacial region, which was diminished by intra-TG administration of selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors. Moreover, satellite glial activation in TG was induced after inferior alveolar nerve injury, administration of satellite glial activation inhibitor in TG significantly reduced satellite glial cell activation and orofacial mechanical hypersensitivity. These findings indicate that nitric oxide signaling and satellite glial activation in TG play a pivotal role in ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury. Including current studies, we discuss peripheral mechanisms underlying ectopic orofacial pain following trigeminal nerve injury.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS10-1 細胞系譜解析による生体内における骨髄間葉系幹細胞の解析

○溝口 利英

松歯大 総歯研

骨髄間葉系幹細胞 (BM-MSCs) は、骨芽細胞と脂肪細胞の共通の起源である。骨粗鬆症患者では骨芽細胞が減少する一方、脂肪細胞が増加する。この所見は、老化にともない BM-MSCs の分化バランスが脂肪細胞側に傾いた結果、骨芽細胞の供給が低下することを示唆する。したがって、BM-MSCs の生体内における骨芽細胞分化調節機構の解明は、代謝性骨疾患の治療に大いに貢献することが予想されるが、その詳細は未だ不明である。

これまで BM-MSCs は、in vitro 培養系もしくは生体への移植実験により、その自己複製や多分化能が評価されてきた。そのため、骨髄内における局在や子孫細胞への分化過程については十分な理解が得られていなかった。そこで我々は、マウスの発生過程における BM-MSCs の起源となる細胞を同定し、その系譜をイメージング技術により捕らえることを試みた。その結果、新生仔期における Osterix (Osx) 陽性細胞の一部が、成体の BM-MSCs に寄与することが明らかになった。Osx 陽性細胞から供給された BM-MSCs は、レプチン受容体陽性細胞として血管に近接した場所に局在し、骨髄組織全体に認められた。細胞系譜解析の結果、これらの細胞は成長にともない骨芽細胞と脂肪細胞に分化することが生体内で示された。一方、BM-MSCs の軟骨細胞への寄与は、発生段階には認められないものの、骨折治癒過程においては確認された。さらに、骨形成誘導薬である、副甲状腺ホルモン (PTH) (1-34) のマウスへの投与は、BM-MSCs から骨芽細胞の分化を亢進することが明らかになり、BM-MSCs の PTH アナボリック作用に対する重要性が示された。以上の所見に加え、本発表では骨のリモデリングにおける BM-MSCs の関与についても議論したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Analysis of in vivo bone marrow mesenchymal stem cells by fate mapping approach

○Mizoguchi T

Inst for Oral Sci, Matsumoto Dent Univ

Both osteoblasts and adipocytes are generated from same origin bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). It is known that while osteoblastic number is decreased in osteoporosis, adipocytic differentiation are accelerated in this situation. This finding suggests that the frequency of BM-MSC differentiation is skewed toward adipocytes and result in decreased osteoblastogenesis. Therefore, understanding of the in vivo BM-MSCs regulation will provide essential information of treatment for metabolic bone disease. However, so far, because BM-MSCs analysis is mainly performed by in vitro culture system, their in vivo regulation is still not clear.

In this study, we tried to identify developmental origin of BM-MSCs using by genetic mouse models. In vivo fate mapping analyses revealed that part of Osterix (Osx)⁺ cells in the neonatal stage contributed to BM-MSCs. Osx⁺-derived BM-MSCs were localized adjacent to blood vessels, and specifically marked by Leptin receptors (LepR). Lineage tracing analyses showed that the LepR⁺ BM-MSCs were in vivo sources of osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes in the bone fractured callus. Furthermore, LepR⁺ BM-MSCs gave rise to osteoblasts in response to parathyroid hormone (PTH) treatment, suggesting that the cells are essential for PTH anabolic effect. Moreover, I will show the possibility that LepR⁺ BM-MSCs contribute to bone remodeling.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS10-2 Wnt と KIT シグナルの活性化バランスによる唾液腺の形づくりと機能獲得過程の制御

○松本 真司¹, 栗本 聖之², 藤井 慎介³, 菊池 章¹

¹阪大 院医 分子病態生化

²阪大 院歯 口外 1

³九大 院歯 口腔病理

唾液腺は発生過程において、未分化な終末部上皮 (end bud) が活発に分岐をしながら管腔・導管構造を形成し、その後 end bud が唾液を産生する腺房へと急速に分化する。しかし、前期にみられる“形づくり”から後期にみられる“分化(機能獲得)”へと経時的に器官の形成が進行していく一連の過程を適正に調節しているシグナル機構についてはいまだ不明な点が多い。

私共は発生に重要な液性因子のひとつである Wnt シグナルを唾液腺形成初期 (胎生 13 日目) より恒常的に活性化したマウスの唾液腺が、胎生 17 日目において腺房分化が著しく抑制されていることを見出した。唾液腺の発生過程において、Wnt シグナル活性は胎生 13 日目で最も高く、胎生 17 日目の腺房分化に向けて経時的に減少した。胎生 13 日目の唾液腺原基を摘出して器官培養すると、end bud は培養 6 日目にかけて急速に多房性の腺房を形成した。器官培養下で Wnt シグナルを活性化すると、培養 6 日における腺房化が抑制され、end bud は未分化な状態に維持されるとともに、導管の形成が著しく促進していた。一方で Wnt シグナルを阻害すると、end bud は早期に腺房化するとともに、導管の形成が抑制された。発生前期における Wnt シグナルの活性化は SCF 受容体である KIT の発現を抑制することによって腺房分化の進行を抑えていた。発生後期では Wnt シグナル活性の減弱にともなって、end bud における KIT の発現が上昇し、AKT の活性化を介した腺房化が誘導された。興味深いことに、発生前期の Wnt による適正な腺房分化の抑制が形づくりとしての導管形成に必要なことを見出している。

本シンポジウムでは、Wnt と KIT シグナルの活性化バランスが器官形成過程における“形づくり”から“機能獲得”へのスイッチングを巧みに調節する新たな機構について紹介したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Regulation of developmental switching of salivary gland between “morphogenesis” and “differentiation”

○Matsumoto S¹, Kurimoto T², Fujii S³, Kikuchi A¹

¹Dept Mol Biol Biochem, Osaka Univ Grad Sch Med

²1st Dept OMFS, Osaka Univ Grad Sch Dent

³Sec Oral Pathol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Growth factor signaling is involved in the development of various tubular organs, but how signaling regulates organ early morphogenesis and late differentiation remains to be clarified. Here, we show how Wnt signaling controls epithelial tubular branching morphogenesis and functional differentiation using the salivary gland as a model. Experiments using genetically manipulated mice and organ cultures revealed that Wnt signaling at early stage (E12-E14) of submandibular salivary gland (SMG) development inhibits end bud differentiation into proacini by suppressing KIT expression. In addition, Wnt signaling at the SMG development early stage promoted end bud cell proliferation, leading to duct formation. In contrast, Wnt signaling reduction at a late stage (E15-E18) of SMG development promoted end bud differentiation into proacini and suppressed duct formation. Our results suggested that Wnt signaling fine-tunes the timing of end bud morphogenesis and differentiation into proacini, in co-operation with KIT signaling.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS10-3 PDGFR α シグナルによる pericytes の運命決定機構

○岩山 智明^{1,2}, 脇坂 聡¹, 村上 伸也²

¹阪大 院歯 口腔解剖 1

²阪大 院歯 口腔治療

組織線維症はコラーゲンなどの細胞外基質によって正常組織が置き換わり、重篤な機能障害に至る慢性疾患である。組織線維化は活性化した線維芽細胞が細胞外基質を過剰に産生することにより起こるとされるが、活性化線維芽細胞の由来や、活性化を引き起こすシグナル経路については不明であった。我々は、毛細血管近傍に位置し、前駆細胞・間葉系幹細胞 (MSPCs) を含む細胞集団とされる周皮細胞 (pericytes) に着目し、間葉組織中の pericytes を標識する分子マーカーとして nestin を見出した。そこで、nestin 陽性 pericytes においてのみ PDGFR α シグナルを亢進するマウスモデルを作製したところ、多臓器に組織線維化を引き起こし、特に白色脂肪組織が線維組織へと置き換わることが明らかとなった。in vitro 分化誘導実験および移植実験により、白色脂肪組織から単離した nestin 陽性 pericytes は脂肪細胞への高い分化能を示したのに対して、同細胞中の PDGFR α シグナルが亢進した場合、脂肪細胞への分化は阻害され、コラーゲンを高発現する線維芽細胞へと分化した。細胞系譜解析を用いて nestin 陽性 pericytes の動態を経時的に観察したところ、高脂肪食投与により脂肪細胞への分化が亢進する一方で、PDGFR α シグナルにより細胞外基質を分泌する線維芽細胞へと直接分化することが明らかとなった。これらの知見から MSPCs である nestin 陽性 pericytes が PDGFR α シグナル亢進により毛細血管を離れ、細胞外基質を過剰に産生する線維芽細胞へと分化し、組織線維化を引き起こすことが示唆された。

成体組織中に存在する MSPCs がどのように組織の恒常性維持を担っているかについては不明な点が多く残されている。歯周組織における同細胞群の同定および lineage hierarchy の解明に向けた、最近の研究結果についても発表させて頂き、同組織の恒常性維持機構につき議論したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Activated PDGFR α signaling in pericytes switches the cell fate

○Iwayama T^{1,2}, Wakisaka S¹, Murakami S²

¹Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Dept Periodontol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Fibrosis is the replacement of normal tissue with extracellular matrix (ECM)-rich scar tissue, which can cause irreversible organ failure. Currently there is no drug capable of limiting or reversing fibrosis, and a major impediment for developing effective treatment has been poor understanding of the biological processes involved in fibrosis. It is known that fibroblasts become stimulated to secrete ECM, but the cellular origin of activated fibroblasts and the signaling pathways leading to fibroblast activation are poorly understood. We have demonstrated that widespread PDGFR α signaling is sufficient to cause progressive, chronic fibrosis in many organs. To address which cell type is responsible for fibrosis, we have generated conditional knockin mice with activated PDGFR α signaling restricted to nestin+ pericytes. Remarkably, this is sufficient to recapitulate multi-organ fibrosis. Nestin+ pericytes express markers for mesenchymal stem cells and have the ability to differentiate into adipocytes in vitro and transplant assays. Lineage-tracing experiments demonstrate that nestin+ pericytes with activated PDGFR α signaling can proliferate and directly differentiate into fibroblasts in fibrotic lesions in vivo. These findings demonstrate that PDGFR α signaling in pericytes altered the cell fate and caused tissue fibrosis.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS10-4 機能的生細胞イメージングとオミクス解析による破骨細胞調節機能の解明

○李 智媛¹, 飯村 忠浩^{1,2}

¹愛媛大 PROS バイオイメージング

²愛媛大 学術支援セ 病態機能解析

Unveiling novel regulatory mechanisms of osteoclasts by combinatorial approaches of functional live-imaging and molecular omics

○Lee J-W¹, Iimura T^{1,2}

¹Ehime Univ, PROS, Div Bio-Imaging

²Ehime Univ, Adv Res Support Center (ADRES)

A G-protein-coupled receptor, CCR5 is a co-receptor of HIV cell entry. Epidemiological and pathological findings have reported that functional changes in CCR5 correlate with HIV transmission and bone destruction disease. However, physiological roles of CCR5 in bone metabolism have not been well documented. Multimodal and multidimensional super-resolution microscopy facilitates to observe irregular microtubule network and podosome arrangement in *Ccr5*^{-/-} osteoclasts, suggesting malfunctions for cell polarity, adhesion and locomotion. Molecular and cellular analyses combining transcriptomics (RNA-sequencing) demonstrated that CCR5-mediated signaling, cooperating with RANKL-mediated signaling, regulated small GTPases, and thus cellular architecture and motility of differentiated osteoclasts were affected. *Ccr5*^{-/-} mice exhibited to be resistant to RANKL-induced bone loss. It showed significantly increased number of and size of osteoclast, although they did not show significant difference in BMD compared to their wild-type littermates. We also approached the proteomics (MS-based phosphoproteomics, LC-MS/MS) to identify new regulators of osteoclasts function, which are stimulated by chemokine ligand. Further, blockades of human CCR5 by anti-hCCR5 neutralizing antibody obviously inhibited osteoclastogenesis in dose-dependent manner, without affect to osteoblast differentiation. Our findings suggested critical role of CCR5-mediated signaling in pathological bone destruction, thus its implications of bone-specific therapeutic targets.

Conflict of Interest: No conflict of interest associated with this research

SS10-5 がん微小環境における血管内皮細胞の特異性解明とその分子機構

○樋田 京子, 間石 奈湖

北大 遺伝子病制御研 血管生物

腫瘍血管新生は腫瘍実質と間質の両方に存在する細胞にとって重要な役割を果たしている。血管新生阻害療法は多くの癌患者に延命効果をもたらしたが、その一方で消化管出血、高血圧などの副作用や薬剤耐性などの問題もある。腫瘍血管は正常血管と比較し形態学的に異なることが知られているが、近年、腫瘍血管の内皮細胞にも様々な特異性があることが知られてきた。われわれもまた、腫瘍血管内皮細胞 (Tumor endothelial cell: TEC) を分離培養し、それらを正常血管内皮細胞と比較することで様々な特異性があることを見出してきた。例えば、TEC は特異遺伝子 (Biglycan, CXCR7, LOX, PTGIR など) を発現し、高い血管新生能をもち、さらに染色体異常や、ABC トランスポーター、P-glycoprotein の発現亢進を伴う薬剤抵抗性や幹細胞様性質をもつことなどを明らかにしてきた。さらに最近、悪性度の異なる腫瘍では TEC の性質が異なることを見出し、がんの微小環境の違いによって TEC にも多様性が存在しうることを明らかにした。なお、TEC における異常性の一部は腫瘍由来の液性因子や extracellular vesicle さらに低酸素環境によって誘導された。このことは TEC はがん細胞またはがん微小環境内の様々な細胞との相互作用によりその特性を獲得していることを示唆する。

さらに、われわれはがん微小環境で変化した TEC が逆にがん細胞やがん幹細胞へ作用している可能性があることを見出している。本シンポジウムにおいては TEC の多様な生物像についてのわれわれの最近の研究内容と共に新しいがん治療戦略の構築に向けての展望について発表したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

The altered phenotype of tumor endothelial cells in tumor microenvironment

○Hida K, Maishi N

Vascular Biol, Frontier Res Unit, Inst. for Genetic Med, Hokkaido Univ

Recent studies have revealed that tumor blood vessels and their endothelial cells are different from those in normal ones. We have reported that tumor endothelial cells (TECs) have distinct alterations in gene expression profiles; upregulation of mRNAs such as Biglycan, CXCR7, LOX, and PTGIR. Furthermore TEC possess a part or stem phenotype, like stem cell marker expression, bone differentiation or spheroid forming. In addition TECs are resistant to anti-cancer drugs with upregulation of p-glycoprotein. Finally, we found the new roles of TECs, regarding interaction with tumor cells. In this symposium, we would like to discuss about the possible anti-cancer strategy based on biology of TEC.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS11-1 東日本大震災における身元確認作業を経験して

○大林由美子, 三宅 実

香川大 医 歯科口腔外科

2011年3月11日、東北から遠く離れた四国では地震を感じることもなく、また日中に発生した震災であったため、夕方ようやく大震災に気づき、居ても立っても居られないという日であった。東日本大震災では全国から多くの歯科医師がそれぞれの団体から派遣され、延べ約2,900名の歯科医師が身元確認作業に当たった。その一員として体験したことや問題点と感じたことについて報告する。2011年5月7日から11日までの5日間、私は日本歯科医師会からの要請で香川県歯科医師会から岩手県に派遣され、検死活動を行った。約2か月経過したその当時でも、何を持って行けばいいのか、どのような体制で、どこに出動するのかといった情報が不足していた。不足のないように器材を準備したが、そのまま持ち帰った器材や装備が多くあった。検死活動では多くの警察官、自衛隊員、海上保安官、医師と協力し歯科所見を採取した。その頃になると遺体搬入数は一桁であったが、歯科所見採取と一緒にポータブルX線装置でデンタルエックス線撮影ができるような工夫がされており、また検案所のレイアウトも手作りではあるが、遺族感情や作業環境を考慮されたものになっており、この2か月間の試行錯誤の賜物であろうと感じた。しかし、総義歯のご遺体の前では歯科所見は有効な個人識別の作業ではないことに悔しさを感じた。このような体験から学んだことはわれわれ歯科医師にとって貴重な財産であると思われる。一歯科医師としてご遺体をご遺族のもとに帰す役割の重要な一端を担っていることを光榮に思う反面、今後の震災のために東日本大震災での問題点を歯科医師の共通認識としてとらえ、日本の身元確認システムを改善していく必要性を感じた。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する

Experience of personal identification of unidentified bodies using dental findings in the Great East Japan Earthquake 2011

○Ohbayashi Y, Miyake M

Dept Oral Maxillofac Surg, Fac Med, Kagawa Univ

The earthquake, known as the Great East Japan Earthquake, occurred on March 11, 2011. Many dentists from the entire prefectures were dispatched by each organization, and a total of about 2,900 dentists were in charge of personal identification. I also went to Iwate and performed identification work in May, 2011. Even two months after that time, there was the lack of any information about the work. We prepared so that there might be no shortage of equipment, but there was a great deal of equipment which was brought back as it was. In the work place, the portable dental X-rays were prepared and the work that photographic findings were associated with the oral examination. Although the layout of the autopsy location was created on site and therefore was housed in a simple building, we were very attuned to the feelings of the bereaved and these feelings were taken into consideration in our work environment. I think that much of this emotional environment was probably the result of the trial and error for those two months. The disaster was regarded by all the dentists as something that needed to be solved for any future earthquake disaster.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS11-2 過去の災害において繰り返されてきた歯科身元確認における問題点

○咲間 彩香, 斉藤 久子, 岩瀬博太郎

千葉大 院医 法医

日本は自然的条件上, 自然災害が起こりやすい脆弱な国土であり, 世界有数の自然災害大国であるといわれている。阪神・淡路大震災や東日本大震災などの地震による災害以外にも, 風水害や雪害などの自然災害でも, 毎年多くの死者・行方不明者が出ている。

東日本大震災では, 津波により多くの身元不明の犠牲者が存在したため, これまでとは桁違いの数の歯科医師が全国から派遣され, 身元確認作業に従事した。しかし, 被災県においてデンタルチャートの書式や, 生前の資料との照合に用いる照合ソフトが統一されておらず, 大規模災害時の身元確認体制の不備による数々の問題点が浮上した。

日本では, 過去に起きた災害や事故の中でも身元確認作業が行われてきたが, 歯科所見による身元確認ではその都度多くの問題点や改善策が訴えられてきた。我々は, 31年前の日航機墜落事故, 21年前の阪神・淡路大震災, そして5年前の東日本大震災における歯科所見による身元確認を比較し, それぞれの災害によって挙げられてきた問題点について再検証した。日本では, 日航機墜落事故当時から書式の統一や歯科身元確認体制に関して改善が求められてきたにもかかわらず, 阪神・淡路大震災や東日本大震災でも同様の反省点が繰り返されていることが明らかとなった。

日本では「歯科所見は身元確認に有用である」と多くの国民に認識されつつある一方, 大規模災害時の歯科所見による身元確認率は, 世界に比較して格段に低い。また, 日本は平時においても2013年度末の身元不明死体累積件数が2万体を超えている。これらの事実も踏まえると, 現行の日本の身元確認体制では, 歯科所見は身元確認においてその有用性を十分に発揮できているとは言い難い。日本は平時および大規模災害時における身元確認体制を早急に見直し, 身元不明死体数減少に向けた対策を講じるべきであると考えられる。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Repeated problems of personal identification using dental findings in past disasters

○Sakuma A, Saitoh H, Iwase H

Dept Legal Med, Grad Sch Med, Chiba Univ

Japan is a naturally disaster-prone country, with a large number of the population being victims of these natural disasters. Following the Great East Japan Earthquake, many dentists were dispatched to the disaster area for identification of the victims. During the identification process, however, many problems surfaced that were due to inefficiency of the identification system being used. Hence, we reviewed identifications using dental findings undertaken for the aircraft accident of “JAL123” of 1985, the Great Hanshin-Awaji Earthquake of 1995, and the Great East Japan Earthquake of 2011, re-evaluating the problems noted at the time of these respective disasters. We found that the common factor during victim identification for past disasters was a similar state of confusion. Although it is recognized that dental findings are useful for identification, the results for disasters in Japan have been markedly less successful than those in the world. Furthermore, even during ordinary times in Japan, the number of unidentified bodies is high. Thus, the Japanese identification system using dental findings are not used effectively not only at the time of disaster but during ordinary times. The Japanese identification system should be reconsidered immediately and thorough countermeasures taken to decrease the number of unidentified bodies.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS11-3 全ての歯科医師が歯科法医学者となる時

○勝村 聖子¹, 佐藤 慶太^{1,2}

¹鶴大 歯 法医

²鶴大 先制医療研究セ

平成 23 年発災の東日本大震災においては、延べ 2,900 名を超える歯科医師が被災地に派遣され、死者約 16,000 名に対して歯科所見による身元確認業務を実施するという、本邦の歯科界が実施した史上最大の身元確認体制となった。しかしながら、東日本大震災における歯科医師の活動状況を見るに、歯科法医学に関する不十分な履修状況が影響し、必ずしも充実した歯科法医学所見を見いだせなかった歯科医師の存在も明らかになっており、人材育成や歯科医師の鑑定能力向上について、大きな課題となっている状況がある。一方、政府は「今後 30 年以内に地震が起きる確率」を発表し、最も危惧される南海トラフ巨大地震におけるマグニチュードは 9.1、首都圏を含む本州の以西及び以南の太平洋側のほぼ全域が被災するとして、最大死者 32 万 3,000 名を試算している。これは死者数から云えば東日本大震災の約 20 倍の規模となり、身元確認体制に必要な歯科医師 58,000 名は本邦で就業する歯科医師数に、ほぼ相当する。被災地域に在住する歯科医師数を考慮すれば、本邦に登録する全ての歯科医師が適切な身元確認等の作業を実施できる体制整備が急務と言える。

現在、歯学教育コアカリキュラム（平成 22 年改訂）および、国家試験出題基準には「個人識別」に関する項目が設定され、歯学教育における法医学的知識の習得が要求される。また東日本大震災以降、各歯科大学・歯学部において歯科法医学分野の教室の開設が進み、現在 12 大学に設置されるに至ったが、未だ十分とは言えない。

本シンポジウムにおいては、歯科医師による東日本大震災における検案支援活動の実際を通し、身元確認における歯科所見の重要性や歯科医師の社会的役割について再認識するとともに、歯学教育機関における歯科法医学の教授体制の在り方や、歯科界として取り組むべき課題について考える場としたい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Why we need to become a specialist in forensic dentistry

○Katsumura S¹, Sato K^{1,2}

¹Dept Forensic Med Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Inst for Res Educ Preemptive Med, Tsurumi Univ

In the Great East Japan Earthquake in 2011, over 2,900 dentists were deployed to the disaster-stricken area to identify 16,000 victims using dental records. The system of personal identity verification was of an unprecedented scale in the history of Japanese dentistry. Meanwhile, the Japanese government estimates the potential death toll in the expected Nankai Trough earthquakes to rise as high as to 323,000. The number is 20 times greater compared to the Great East Japan Earthquake. Accordingly, 58,000 dentists would be required to undertake the identification task on site. Therefore, it is imperative for every dentist in Japan to acquire knowledge and skills of personal identification based on dental records.

Today, we'd like to take this opportunity to review the identification activities conducted by dentists following the Great East Japan Earthquake, and then, to recognize the social importance of dental records in the process of personal identification as well as the role of dentists in the situation. Through an active discussion, we hope to exchange ideas about the framework of teaching forensic dentistry at educational institutions and about challenges confronting dentistry today.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS11-4 大規模災害時における身元確認：歯科界の対応

○佐々木啓一^{1,3}, 青木 孝文², 鈴木 敏彦³, 佐藤真奈美⁴

¹東北大 院歯 口腔システム補綴

²東北大 院情報科学

³東北大 院歯 歯科法医情報

⁴宮城県歯科医師会

東北大学大学院歯学研究科・歯学部は、東日本大震災に際し多様な震災対応活動に携わった。特に犠牲者の身元確認では、宮城県歯科医師会との連携のもと、累計 400 名以上の歯科医師を派遣するとともに、宮城県警、日本歯科医師会等との連絡調整に関わった。現実を経験し、種々の課題に直面した経験とを、今後の展開のために後世に伝えていくことが私どもの責務と考えている。

さて歯科情報は、現在では、身元不明遺体あるいは痴呆等での身元不明者の身元確認における有力な情報源となっている。東日本大震災時では、津波被害そして冬場という特殊な状況であり、犠牲者の 80% 以上が着衣や身体的特徴から身元が判明したが、これら以外では歯科情報により身元確認に至った犠牲者が半数以上を占める。歯科情報からの身元確認は、犠牲者から採得する死後情報と、行方不明者の歯科診療記録等から得られる生前情報とのマッチングによってなされる。東日本大震災では、青木が作成したコンピュータソフトにて解析し、効率的に作業を進めることができた。大規模災害時における身元確認の革新的な進歩である。32 本の歯を、その有無を含めて 5 カテゴリーに分類しただけでも 5³²パターンとなり、その照合により得られる結果の精度は極めて高い。歯科情報の有効活用のための今後の課題は、死後情報の正確な記録と、生前情報の効率的な収集を如何に行い得るかという点に尽きる。すなわち治療内容を含めた記録コードの統一と、生前情報のバンク化を進めていくことが重要である。これらに関して、我が国では現在、厚労省、警察庁、日本歯科医師会に青木ら有識者が参画し、計画が進んでいる。またグローバル社会の今日、スマトラ沖地震の際のように災害犠牲者は多国籍に渡るため、これらの国際標準化も喫緊の課題である。現在、ISO で規格化の委員会が立ち上がっている。歯科医師は身元確認に大きな責務を有しており、必要な知識を身に付けることが求められる。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Disaster victim identification by dental records : Response of dental society

○ Sasaki K¹, Aoki T², Suzuki T³, Satoh M⁴

¹Tohoku Univ Grad Sch Dent, Div Adv Prosthet Dent

²Tohoku Univ Grad Sch Information Sci

³Tohoku Univ Grad Sch Dent, Div Dent Digital Forensics

⁴Miyagi Pref Dent Assoc

Tohoku University Graduate School of Dentistry have played numerous roles in disaster responses and recovery for Great East Japan Earthquake, especially a great role in disaster victim identification. At present, the dental information (e.g., dental charts, radiographs, progress notes) is a valid and useful information for a positive identification of unknown human remains or a living amnesiac. Dental forensic identification is done by the comparative analysis of postmortem data and antemortem data submitted from the dentist or dentists who treated the patient during life. Although the vast majority of dental materials are submitted on paper and on radiographic film, the ultimate goal is to create a standardized electronic format to transfer this data. It is also recognized that increased application of information technology standards and electronic transactions reduces the time required for data transfer and the costs associated with it, by providing a seamless information exchange. Disaster Victim Identification, due to the number of victims and, in many cases, the number of countries of origin of the victims, will benefit from this international standardized dental and oral data set.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS12-1 SCADA is Unique! 日本におけるスチューデントクリニシャンリサーチプログラム 22年の歩みを振り返る

○奥村 哲¹, 石田 陽子²

¹静岡理工大 総合情報 神経行動

²新潟大 院医歯 歯教研開発

近年、基礎医学系の学会を中心に、多くの学会が歯科の学部学生にも開かれた研究発表の機会を提供するようになってきた。中でも、日本歯科医師会／デンツプライ スチューデントクリニシャンリサーチプログラム (SCRP) では、2015年の第21回大会までに、筆頭発表者であるクリニシャン、共同研究者であるコ・クリニシャンを合計すると、のべ約400名の歯科学生が、自ら行った研究を発表してきた。彼らのほとんどは同プログラムの同窓会組織であるSCADA会員であるが、日本におけるSCADAメンバーの年齢層はまだ若く(9割以上が30代以下)、歯科基礎分野、あるいは臨床の各分野の教育、研究の実践に多くの貢献を始めている。例えば、歯科基礎医学会の2015年度学術大会(新潟)においては、少なくともサテライトシンポジウム80演題中5名、口頭発表(98演題中)5名、ポスター発表(292演題中)11名、学生セッション(10演題中)2名というように、全480演題中、22演題(約4.6%)以上にSCRPの経験者が研究発表を行っていた(いずれものべ人数。一部に改姓などによる数え落としもありえるので人数はやや少なめの概算)。SCRPにおいて発表できる演題数は、各歯科大学、歯学部から毎年1演題に限られていることを勘案すると、このプログラムのOB/OG達の歯科基礎分野における活動や貢献は極めて大きいと考えられ、SCRPは多くの人材を輩出してきたと言える。そこで、本学術大会に先立つサテライトシンポジウムの機会に、改めてSCRPが如何にユニークな若手人材をこれまで輩出してきたかを、何名かの事例を元に共有すると共に、今後の国際的視点にたった日本の歯科基礎医学の発展のために、このプログラムの参加者に、これからどのような貢献が望まれているかを会場の声を交えて討論する。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

SCADA is Unique! 22 years history of the JDA / DENTSPLY Student Clinician Research Program

○Okumura T¹, Ishida Y²

¹Dept Human-Comp Interface Design, Shizuoka Inst Sci Technol

²Div Dent Edu Res Dev, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Many academic societies of basic medical sciences have provided dental students rich opportunities to share their research results. Among them, the Japan Dental Association / DENTSPLY Student Clinician Research Program (SCRP) has been motivating more than 400 dental students in last 21 years. More than 90% of the alumni members of this program, the SCADA-Japan associates, are 30's or younger generation. However, they have made significant contributions to research and / or education in both basic and clinical dentistry. For example, at the 57th annual meeting of the Japan association for oral biology in 2015, more than 22 past participants presented their recent results (5 presentations in satellite symposiums, 5 in oral presentations, 11 in poster presentations and 2 at student sessions). It was appropriately 4.6% of the total presentations. Considering the fact that the only one research title was allowed to represent their dental schools a year for SCRП, this 4.6% must be a substantial proportion of the presentations. In this satellite symposium, we will further introduce how the SCADA associates have been contributed to the society and try to perspective members' future role as a researcher or a mentor of students who are willing to perform their researches.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS12-2 Show the Spirit of Scientist !!! ～SCRP 大会を通して見つけたこと～

○小林 良喜

日大松戸歯 微生物免疫

日本歯科医師会 / デンツプライ スチューデントクリニシャンリサーチプログラム (SCRP)は全国の歯科学生が一堂に会して自分の行ってきた研究について英語で発表できる数少ない場です。日本大学松戸歯学部はこれまでに、第3回大会から第22回大会まで14名が参加し、うち2名(金親あや乃先生[7期], 合田悦子先生[14期])は優勝という栄誉を得ることができました。

自ら考えて問題を解決する力は分野を問わず、必要になります。従来から問題解決力が叫ばれていましたが、近年、日本国内だけでなく世界規模に立った視点を踏まえ、さらに、歯科界にとらわれず、医学・工学・心理学など多分野にまたがる理解の必要性が叫ばれています。学生自らが興味を持ったことをファカルティアドバイザーが中心となり、「興味」(問題点)を「解決」(仮説と証明)し、得られた結果を「考え」(考察と結論)で、「発信」(発表)する一連の作業は大きな自信となって、歯科医師となってから大いに役立つと思います。SCRP大会に参加した学生は、卒業後、臨床医や研究者として歯科医院・大学・研究所など様々なフィールドで活躍されています。近年、SCRP大会は毎回ほぼすべての歯科大学からの参加があります。これは、在学中に研究活動に興味を持つ者同士が集まることで大学間を超えた交流は、大きな原動力になると思います。本シンポジウムでは松戸歯学部での事例を紹介することで、SCRP大会への取り組みと参加した学生の歯科医学への貢献を考えてみたいと思います。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言します。

Show the Sprit of Scientist !!! ～ What we found from SCRП～

○Kobayashi R

Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

The Student Clinician Research Program (SCRП) were supported by Japan dental association and DENTPLY since 1995. Nowadays, selected dental students are gather at Tokyo and they presented own research projects in english. In Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 14 student were join and presents in SCRП and two students (Ms. Ayano Kaneoya [year 2000] and Ms. Estuko Aida [year 2008]) got first prize to attend American Dental Association (ADA) meeting for representative.

Faculty adviser and mentor are always welcome to support to clarify the questions.

Today, we would like to discuss with you for uniqueness of SCRП and admire dental students who commit to resolve the problem.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS12-3 SCRP に出場しよう！～SCADA と歯科基礎医学～

○楠山 譲二

鹿大 院医歯 口腔生化

日本歯科医師会／デンツプライ スチューデントクリニシャンリサーチプログラム（SCRP）は、2016年で第22回を数えるまでとなった。各歯科大学・歯学部におけるSCRPの参加率も最近是非常に上昇している。SCRP参加学生の満足度も概ね高く、SCRPを通じた研究実践経験は一定の役割を果たしていると考えられる。一方で、その指導には各研究室に多大な労力を負担していただいていることも事実であり、参加校における実情などから参考すべき点も多いと予想される。近年、SCRPで発表したOB/OG（SCADA会員：SCRP参加者で組織する同窓会組織）が大学等で研究／教育職に従事することが増えており、中でも、SCRP経験者が新たにSCRPに参加する学生のファカルティーアドバイザーとなったり、実際に研究指導に携わるようになってきた。これはSCRPが果たした歯科医学の人材育成プログラムとしての1つの成功であると同時に、SCRP参加を目標とした研究実践をSCADA会員の手によって助力するシステムができつつあることを窺わせる。本セッションでは、SCADA会員（教官および学生）がどのように関わり、どのような成果を挙げることができたかを含め、各歯科大学・歯学部でのSCRPへの取組みについて議論したい。

【利益相反】 利益相反状態にありません。

Let's participate in SCRPP! ～ SCADA and oral biology～

○Kusuyama J

Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

We will have 22nd the Japan Dental Association / DENTSPLY Student Clinician Research Program (SCRPP) in 2016. Every dental school has recognized "what is SCRPP" and the participation rate of SCRPP has been increasing in recent convention. Student satisfaction is relatively high. We now evaluate the significant roles of SCRPP in dental education for oral biology. However, we need to consider the problem that each dental laboratory expends much time and effort on helping dental students to participate in SCRPP. The alumni members of SCRPP, the SCADA-Japan associates, have recently become researcher and / or educator in dental universities. In addition, it is also important to mention that some associates have been faculty advisers for dental students or involved in the teaching of experiments. This is one of the successful example of SCRPP in human resources development of dentistry. In this session, we will show the involvements of the SCADA associates in the technical and mentoring helpfulness and discuss the approaches and issues on SCRPP in dental universities.

Conflict of Interest: The author has no financial relationships to disclose.

SS13-1 Salivary glands: a unique and valuable system for oral biology and all biomedical science

○Bruce J. Baum

Scientist Emeritus, Natl Inst Dent Craniofac Res

There are many reasons why a scientist might choose to study salivary glands, from random chance (my case) to clinical relevance. However, the most impressive one to me is that these tissues are associated with the generation of many sophisticated scientific discoveries. For example, in the pre-Nobel Prize era (1860s) Claude Bernard used salivary glands to demonstrate the fundamental principle that organ function was regulated through opposing effects on different nervous systems. Furthermore, one of the first Nobel prizes awarded was given for studies specifically on salivary glands. Ivan Pavlov received the 1904 prize in Physiology or Medicine (the fourth year it was awarded) for discovering conditioned reflexes. Indeed, to hear Pavlov's name reminds any biologically educated person of a dog salivating. Additionally, three other Nobel prizes have been awarded based on work either focused on salivary glands or substantively related to them. Stanley Cohen received the prize in Physiology or Medicine in 1986 for his role in discovering growth factors, specifically epidermal growth factor, which he isolated from mouse submandibular glands and originally termed "tooth-lid factor". Cohen's prize was shared with Rita Levi-Montalcini, a close collaborator for many years. She is of course known for discovering nerve growth factor (NGF), though not originally in salivary glands. However, she later showed that salivary-derived NGF was important systemically after its secretion from mouse submandibular glands. The two Nobel prizes awarded for work related to salivary glands were George Palade's prize in Physiology or Medicine in 1974 for defining the machinery involved in exocrine cell protein secretion and Peter Agre's 2003 prize in Chemistry for discovering the aquaporins. Thus, salivary glands, which are not a critical-for-life organ and not a site of the most common major diseases, notably have played key roles in modern biomedical science. This reminds us that they are tissues not only in the purview of oral biologists, but also valuable experimental tools providing broad, and seminal, biological insights. The speakers in today's symposium are presenting new findings in diverse fields using salivary gland models and, in doing so, are following a long and honored scientific tradition.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest.

SS13-2 胎仔マウス唾液腺の組織間における RNA 相互作用

○林 徹^{1,2,3}, 柏俣 正典², Matthew P Hoffman³

¹北里大 医衛 解剖

²朝日大 歯 薬理

³NIH NIDCR

上皮間充織相互作用は、器官形成における組織間コミュニケーションの基本的な様式であり、それら相互作用を仲介するのは主に成長因子や細胞外マトリックスと考えられてきた。興味深いことに、植物、線虫、昆虫などでは組織間をまたいだ RNA 輸送が知られている。ヒトでは、RNA を内包するエクソソームという小胞が様々な体液から見つかっているものの、上皮間充織相互作用において RNA がシグナルとして寄与するかどうかは分かっていない。

我々は、上皮間充織相互作用を調べるうえで有用なモデル器官である胎仔マウス顎下腺を用いて、組織間 RNA 輸送の有無を検証した。その結果、胎仔マウス顎下腺の発生過程において、マイクロ RNA を内包するエクソソームが間充織から上皮へと輸送されることが示唆された。短鎖ノンコーディング RNA であるマイクロ RNA は、標的とするメッセンジャー RNA に結合し、その遺伝子発現を負に制御する働きをもつ。胎仔マウス顎下腺由来のエクソソームから検出されたある種のマイクロ RNA は、上皮に輸送された後、エピジェネティクスに関連する遺伝子を標的としていた。また、輸送されたマイクロ RNA の機能を阻害すると、上皮の形態形成が阻害された。これらの結果から、胎仔マウス顎下腺の間充織から上皮へのエクソソームを介したマイクロ RNA 輸送は、その器官形成において上皮の形態形成を調節していることが示唆された。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

RNA interactions between tissues in fetal mouse salivary glands

○Hayashi T^{1,2,3}, Kashimata M², Hoffman MP³

¹Dept Anat, Kitasato Univ Sch, Allied Health Sci

²Dept Dent Pharmacol, Asahi Univ Sch Dent

³NIH, NIDCR

Epithelial-mesenchymal interactions are a fundamental form of intercellular communication between tissues during organogenesis. These interactions have been principally attributed to secreted signals such as growth factors and extracellular matrix. Interestingly, transport of RNA across tissue boundaries has been characterized in plants, worms, and insects. In human, exosomes containing RNAs circulate in various body fluids. However, whether the mobile genetic signals also regulate epithelial-mesenchymal interactions during organogenesis is not understood.

The fetal mouse submandibular gland (SMG) is a useful model to study the interaction between epithelium and mesenchyme during organogenesis. Here we identify that exosomes containing microRNA (miRNA) are a mobile genetic signal from mesenchyme to epithelium during SMG organogenesis. The exosomal miRNA targeted a gene that was predicted to participate in epigenetics. Inhibition of the exosomal miRNA resulted in suppression of epithelial branching morphogenesis. Taken together, our data suggests that exosomal transport of the miRNA from mesenchyme to epithelium during SMG organogenesis regulates epithelial branching morphogenesis.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS13-3 顎下腺腺腔構造維持における RhoGTPase Cdc42 の役割

○設楽 彰子, Roberto Weigert

NCI, NIH

管腔臓器が適切な管腔のホメオスタシスを維持することは臓器が正常な機能を営む上で重要であるが、この過程を制御する仕組みには不明な点が多い。本研究で我々はマウス顎下腺を管腔臓器のモデルとして用い、管腔上皮の維持機構を調べた。

Rho ファミリー低分子量 GTPase である Cdc42 は細胞間結合や細胞極性の制御分子としてよく知られている。我々は Cre/loxP に基づいたマウスモデルを用いて *in vivo* で Cdc42 をノックアウトし、Cdc42 の消失により顎下腺腺房細胞の腺腔側膜が拡張することを明らかにした。免疫組織化学解析から、拡張した腺腔側ドメイン上において腺腔側と基底側のタンパク質が混在すること、および腺腔側膜上に局在する極性タンパクである Par6 が減少することが示された。驚いたことに、腺腔側膜の明らかな形態変化に関わらず、Cdc42 ノックアウト細胞のタイトジャンクションタンパク質の局在および細胞間の透過性は維持されていた。また同様の手法を用いて肝臓の Cdc42 をノックアウトしたところ微小胆管の拡張がみられたことから、Cdc42 を介する管腔上皮の維持機構は管腔臓器に共通した仕組みであることが示唆された。本研究から Cdc42 は細胞極性の制御を介して管腔上皮の維持に貢献するという、管腔臓器のホメオスタシスを維持するための重要な分子機構が示された。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

The Rho GTPase Cdc42 is required for maintenance of submandibular gland lumen

○Shitara A, Weigert R

NCI, NIH

Maintaining the proper lumen homeostasis in tubular organs is fundamental for their function, and little is known about the mechanisms regulating this process. Here, we used the submandibular salivary glands (SMG) in live mice as a model organ, and examined the mechanisms implicated in maintenance of the epithelial lumen.

The small Rho GTPase Cdc42 is a well-known regulator of cell junction and polarity. We depleted Cdc42 *in vivo* by using a Cre/loxP-based mouse model, and found that the loss of this protein induces the expansion of the apical plasma membrane in the acinar cells of the SMG. Immunofluorescence analysis revealed mixing of the apical and basolateral proteins in the expanded apical domain, as well as loss of the polarity protein Par6. Surprisingly, we found that despite the pronounced effects on the morphology of the apical lumen, both tight junctional proteins and paracellular permeability are not affected. Our findings demonstrate that Cdc42 contributes to maintenance of epithelial lumen through regulation of cell polarity, providing important molecular insights into organ homeostasis.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS13-4 マウスを用いた唾液腺の生理学的解析

○近藤 祐介¹, 中本 哲自², 向坊 太郎¹, 宗政 翔¹, 楠田優一郎¹, 宮城 勇大¹,
柄 慎太郎¹, 正木 千尋¹, 細川 隆司¹

¹九歯大 口腔再建リハ

²松歯大 補綴

われわれはマウスを用いて唾液腺機能に関する研究を行っており、その結果を報告したい。まずマウス3大唾液腺の機能を *in vivo* で比較したところ、耳下腺からの腺重量あたりの唾液分泌量は顎下腺、舌下腺と比較して2倍以上であった。その原因としては、耳下腺において腺房細胞内のCa²⁺上昇やCl⁻の放出量が顎下腺や舌下腺と比較して大きいことや、Ca²⁺-activated Cl⁻ channelであるTransmembrane member 16A (TMEM16A)の発現量が高いことが明らかになった。コンディショナルノックアウトマウスにおける解析により、TMEM16Aはムスカリン性刺激に引き起こされる唾液分泌を担うCl⁻チャネルであることが明らかになったが、その一方でvolume-regulated anion channelの関与するTMEM16A非依存性唾液分泌の存在も示唆された。また、モデルマウスを用いて全身疾患、全身状態が唾液腺に及ぼす影響の評価も行っている。まず2型糖尿病モデルマウスとしてKK-Ayを用いたところ、KK-Ayにおいて唾液分泌量はコントロールと比較し低下し、その原因として小胞体からのCa²⁺放出の抑制の関与が示唆された。老化促進モデルマウスとしてはsenescence-accelerated prone mouse1 (SAMP1)を用いた。現在、24週齢までの解析を終了したが、唾液分泌量、唾液中イオン濃度、唾液中総タンパク質量、さらに細胞内Ca²⁺の上昇にコントロールとの有意差はみられず、加齢による影響は認められていない。SAMP1の寿命は約48週とされており、さらに高齢のマウスでの解析を予定している。

【利益相反】 開示すべき利益相反状態はない。

Physiological analysis of mouse salivary gland fluid secretion

○Kondo Y¹, Nakamoto T², Mukaibo T¹, Munemasa T¹, Kusuda Y¹, Miyagi Y¹, Tsuka S¹,
Masaki C¹, Hosokawa R¹

¹Div Oral Reconstr Rehabil, Kyushu Dent Univ

²Dept Prosthodont, Sch Dent, Matsumoto Dent Univ

We have analyzed salivary gland function with mouse and will talk about our recent results. To compare three major salivary gland function, pilocarpine-induced *in vivo* salivation from parotid (PG), submandibular (SMG), and sublingual glands (SLG) were collected. When normalized by gland weight, the saliva amount from PG was greater than SMG and SLG. We found that larger intracellular Ca²⁺ increase, Cl⁻ release from acinar cells and greater expression of Transmembrane member 16A (TMEM16A), Ca²⁺-activated Cl⁻ channel, resulted in larger salivation from PG. Examination with conditional knockout mouse revealed that TMEM16A was obligate Cl⁻ channel for muscarinic agonist-induced salivation. On the other hand, we found that isoproterenol induced TMEM16A-independent salivation and volume-regulated anion channel was involved it. We utilized type 2 diabetic KK-Ay mice and found that salivation from KK-Ay SMG was less than control and decreased Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum might cause it. Senescence-accelerated prone mouse (SAMP1) was used as aging model. We had already analyzed salivary function in 24-week-old SAMP1. Secreted saliva, ion concentration, secreted protein and intracellular Ca²⁺ increase in acinar cell were comparable in SAMP1 and control. However, further analysis using older mice is required.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

SS13-5 唾液腺における概日リズムの発生と生後発達過程の検討

○内田 仁司

鶴大 歯 病理

24 時間型社会によって、生活リズムの変調による睡眠障害、消化器症状など健康への影響が大きな問題となっている。口腔領域では、唾液分泌障害を呈する患者が増加しており、摂食・嚥下、会話などの生活の質の低下を訴えている。

ヒトの安静時唾液分泌は、昼間に増加し、夜間に減少する日内変動を示すことが知られているが、その詳細な制御機構は明らかではない。この日内リズムが破綻すると口腔の不快感を訴えることが想定されることから、唾液腺の時計機構の検討は唾液分泌障害の解明に有益であると考えられる。

演者らは、顎下腺において水分泌に関与する *Aqp5* の発現に日内変動が存在することを明らかにし、概日リズムが唾液分泌能に関与することを報告してきた。本研究では、概日リズムの正常な発生過程、生後発達過程における環境要因の影響を理解することで、概日リズム障害を介した唾液分泌能の変動について解明することを目的とした。

遺伝子組換え発光レポーター (PER2::LUC) マウスを用い、胎生期における顎下腺の概日リズムを測定し、生後発達期における顎下腺の概日リズムの解析は体内時計の中核である視交叉上核の概日リズムと比較することで成熟過程の検討を行った。

胎生期顎下腺の長期器官培養の条件下において、分枝形態形成の進行に伴って明瞭な概日リズムが発生することが明らかとなった。生後発達期において、視交叉上核では一貫してマウスの活動期である夜間の前半に概日リズムのピークがみられた。しかしながら、顎下腺概日リズムのピークは、出生直後は休止期 (昼間) の前半に認められたが、成長と共に夜間にシフトすることが明らかとなった。このピークのシフトは、親マウスの世話行動の時間帯の変遷に一致していた。

以上から、器官の分化段階と概日リズムは密接に関連することが示唆された。また、正常な生後発達には、世話行動などの環境要因が重要な役割を果たしていると考えられた。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Tissue-autonomous development of the circadian rhythm in salivary glands

○Uchida H

Dept Pathol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

In the modern 24-h society, many individuals complain of symptoms such as sleep disorder and functional dyspepsia. Furthermore, some people develop xerostomia (dry mouth) with oral discomfort and difficulty swallowing during daily life. Unstimulated saliva reportedly shows circadian rhythms in flow rate and composition, and salivary glands have an intrinsic clock function. In addition, we demonstrated that 24-h *Aqp5* expression by submandibular glands is dominantly regulated by the central clock in the suprachiasmatic nucleus. The *Cry*DKO mouse, which lacks a functional circadian clock, does not show circadian fluctuations in *Aqp5* expression. These findings suggest that the circadian rhythm affected the physiological function of the salivary glands. This study sought to clarify the developmental process for circadian rhythms in salivary glands, in order to understand the diseases caused by circadian rhythm disorders. Here we show the development of circadian rhythms during the embryonic stage and the process of maturation during postnatal development. Furthermore, we show tissue-autonomous development of circadian rhythms under tissue culture conditions. These results indicate that the circadian rhythm in salivary glands is related to tissue differentiation. It is considered that environmental factors such as nursing play important roll for maturation of circadian rhythms during postnatal development.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS14-1 味細胞研究のパラダイムシフト ～味蕾幹細胞の同定と味覚研究への応用～

○岩槻 健

東農大 応生 食安健

高齢化社会を迎える今、美味しく食べて健康を保つ事は誰もが願う事である。美味しさは五感により感知されるが、中でも味細胞が中心的な役割を担っている。味細胞は、消化管の上皮細胞と同様に再生を繰り返す細胞であり、その個体の生涯を通じて味細胞を再生し続ける味蕾幹細胞が存在する事は分かっていた。近年、消化管幹細胞の研究は飛躍的に進んだが、味蕾幹細胞については不明な部分が多く、研究は進んでいなかった。

我々は、味蕾幹細胞の分子マーカーの探索から研究を開始し、少しずつその全容を明らかにしようと試みた。その結果、味蕾幹細胞が存在する環境には常に Wnt という増殖因子とその関連分子が存在する事が分かってきた。その後、2013年に Wnt の下流分子である Lgr5 が消化管幹細胞と同様に味蕾幹細胞・前駆細胞のマーカーとなる事が分かってきた。続いて2014年には、味蕾幹細胞が消化管幹細胞と同様にオルガノイド培養法により維持・継代できる事を証明した。オルガノイド培養系を用いる事で、単一の味幹細胞から様々な系列の味細胞に分化する事が示されたばかりでなく、実際に味物質に反応する成熟味細胞へも分化する事が明らかとなった。現在、同培養系を用いて味蕾幹細胞から成熟した味細胞へ変化する際の分化メカニズムについて詳しく調べている。

これらの研究の成果により、ホ乳類独特の味覚受容機構についての基礎的理解が深まるばかりでなく、味覚消失・味覚異常等の治療への応用につながる事が期待される他、これまで困難であった味細胞を用いた種々の呈味物質のスクリーニングや味細胞分化のメカニズム解析などへの応用が期待される。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

The paradigm shift in taste research ～Identification and application of taste stem cells～

○Iwatsuki K

Tokyo Univ Agric, Dept Nutr Sci Food Safety

Despite living in an aging society, we have a desire to live a healthy life through eating tasty foods. It is clear that taste cells regenerate, while there had been a paucity of molecular and biochemical information of the stem cell *Niche* making it difficult to identify and manipulate taste stem cells. Therefore, we have done extensive screening of the gene expression where taste stem cell presumably arise and finally found that Wnt related molecules are key factors in the *Niche*. By analogy to how intestinal stem cells are cultured *in vitro*, we have recently reported a new method to culture taste stem cells. These taste stem cells have ability to differentiate into mature taste cells. Currently, we are analyzing the mechanism of how taste stem cells turn into mature taste cells.

The knowledge gained from our present study will not only provide the basic understanding of taste system in mammals but also provide the foundation for future therapies to treat ageusia and dysgeusia patients.

Conflict of Interest: The author declares no conflict of interest associated with this manuscript.

SS14-2 ミラクリンによる甘味誘導効果の分子メカニズム

○實松 敬介¹, 吉田 竜介^{1,2}, 重村 憲徳¹, ニノ宮裕三³

¹九大 院歯 口腔機能

²九大 OBT 研究セ

³九大 味嗅覚センサ 感覚生理

ミラクルフルーツに含まれるタンパク質・ミラクリン(MCL)は、酸性条件下で甘味誘導効果を有する。MCLの感受性には種差があり、ヒトには有効でマウスには無効である。また、酸の種類によりその効果に違いがあり、強酸より弱酸の方が強い甘味誘導効果を呈する。本研究では、甘味受容体 TAS1R2 + TAS1R3 を HEK293 細胞に強制発現させた甘味受容体再構築系を用い、TAS1R2 + TAS1R3 と MCL との相互作用について解析を行った。ヒト TAS1R2 + TAS1R3 を発現させた細胞は、酸性条件下で MCL による甘味誘導効果を示した。また、その効果は強酸の HCl より弱酸のクエン酸の方が強かった。一方、マウス TAS1R2 + TAS1R3 を発現させた細胞は MCL の感受性を示さなかった。MCL の感受性の種差を用いたヒト-マウス・キメラ体の解析により、MCL がヒト TAS1R2 の N 末端ドメインに作用することが明らかにされた。さらに点変異を用いた解析から、ヒト TAS1R2 の細胞外、細胞内、両領域のヒスチジン残基が MCL による甘味誘導効果に重要であることが示唆された。細胞内 pH を測定するとクエン酸は、HCl より HEK293 細胞の細胞内酸性化を強く引き起こした。また MCL の甘味誘導効果は、酸の種類に関わらず細胞内 pH に比例していた。これらの結果から、細胞内酸性化が MCL による甘味受容体の完全活性化に深く関与していることが示唆された。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Molecular mechanisms for the sweet-inducing effect of miraculin

○Sanematsu K¹, Yoshida R^{1,2}, Shigemura N¹, Ninomiya Y³

¹Sec Oral Neurosci, Grad Sch Dent, Kyushu Univ

²OBT Res Centr, Kyushu Univ

³R & D TAOS, Kyushu Univ

Miraculin (MCL) is a glycoprotein which induces sweet taste by acidification in humans, but not in mice. The effect of MCL is more intense when acidification occurs with weak acids as opposed to strong acids. Here, we focused on the molecular mechanisms for the activation of the sweet taste receptor induced by MCL. Utilizing a sweet receptor hTAS1R2 + hTAS1R3 assay, MCL-applied cells displayed a pH dependence with citric acid (weak acid) being right shifted to that with HCl (strong acid). Using mixed-species pairings of human and mouse sweet receptor subunits and chimeras, we confirmed that the amino-terminal domain of hTAS1R2 is required for the sweet-inducing effect of MCL. Replacement of histidine residues to alanine in both the intracellular and extracellular region of hTAS1R2 reduced or abolished the sweet-inducing effect of MCL. Intracellular acidification of HEK293 cells was induced more strongly by citric acid than by HCl. The sweet-inducing effect of MCL was proportional to intracellular pH regardless of acid types. These results strongly suggest that intracellular acidification is required for full activation of the sweet taste receptor by MCL.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS14-3 咀嚼不全により低下した神経新生と嗅覚機能とその回復

○柏柳 誠, 宇津木千鶴

旭川医大 生理 神経機能

アルツハイマー病のケーススタディーから、咀嚼と認知機能が関連する可能性が指摘されている。成体の脳では、海馬とともに脳室下層が活発に神経新生をしていることが知られている。脳室下層で新生した細胞は、嗅覚の一次中枢として働く嗅球で嗅覚機能に重要な役割を果たしている。我々は、咀嚼不全の状況を作り出すために、マウスを粉末飼料で飼育した。その結果、脳室下層における神経新生が低下するとともに嗅覚機能が低下することを見いだした。次に、低下した機能を改善するために固形飼料で飼育した。その結果、脳室下層における神経新生と嗅覚機能の回復を認めた。固形飼料と粉末飼料の摂餌の影響を調べるために、絶食させたマウスに2つの飼料を節食させて神経興奮を解析した。その結果、三叉神経主知核、脚橋被蓋核、黒質緻密部の神経細胞が粉末飼料に比べて固形飼料の摂餌により興奮した。この結果から、固形飼料の摂餌により、口腔内の体性感覚刺激が黒質緻密部のドーパミン神経を活性化して脳室下層の神経新生を維持・促進することにより嗅覚機能を維持する可能性が示唆された。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Reduction of neurogenesis and olfactory function by impaired mastication and its recovery

○Kashiwayanagi M, Utsugi T

Dept Sensory Physiol, Asahikawa Med Univ

Recent studies have shown that a reduction of mastication impairs both neurogenesis in the hippocampus and brain functions. The subventricular zone (SVZ) generates an immense number of neurons even during adulthood. These neurons migrate to the olfactory bulb (OB) and differentiate into interneurons. Bromodeoxyuridine-immunoreactive (BrdU-ir) structures in sagittal sections of the SVZ and in the OB of mice fed a soft or hard diet were studied to explore the effects of changes in mastication on newly generated neurons. After 1 month, the density of BrdU-ir cells in the SVZ and OB was lower in the soft-diet-fed mice than in the hard-diet-fed mice. The odor preferences of individual female mice to butyric acid were tested in a Y-maze apparatus. Avoidance of butyric acid was reduced by the soft-diet feeding. We then explored the effects of the hard-diet feeding on olfactory functions and neurogenesis in the SVZ of mice impaired by soft-diet feeding. At 3 months of hard-diet feeding, avoidance of butyric acid was reversed and responses to odors and neurogenesis were recovered in the SVZ. Then, we examined the difference in Fos-immunoreactivity (Fos-ir) at the principal sensory trigeminal nucleus (Pr5), which receives intraoral touch information via the trigeminal nerve, when female adult mice ingested a hard or soft diet to explore whether soft-diet feeding could mimic impaired mastication. Ingestion of a hard diet induced greater expression of Fos-ir cells at the Pr5 than did a soft diet or no diet. The present results suggest that feeding with a hard diet improves neurogenesis in the SVZ, which in turn enhances olfactory function at the OB.

Conflict of Interest: No

SS14-4 味覚と嗅覚の皮質内情報統合機構

○溝口 尚子¹, 小林 真之², 村本 和世¹

¹明海大 歯 形態機能成育 生理

²日大 歯 薬理

化学感覚(味覚・嗅覚)は、口腔顔面領域に受容器を有する点で歯科医学と関連が深い。どちらの化学感覚も身体に影響を及ぼす化学環境を把握するために重要な情報となるが、食事の際には口腔内で生じた味とニオイの情報が脳内で統合され風味という新たな感覚形成に寄与する。風味とは更に触感や温度などの情報も加わった立体的な感覚である。しかし、風味形成に関する知見は心理学や食品科学から得られたものが多く、神経生理学的な知見は少ない。

近年、fMRIを用いたヒトでの研究などによって島皮質(IC)に味覚だけでなく嗅覚情報も入力する知見が集まってきた。そこで我々はIC及び周辺皮質領域に注目し、味とニオイの情報が風味として統合処理される皮質内情報機構を解明する目的で研究を行っている。

味覚情報を伝える末梢神経・鼓索神経(CT)と嗅覚の一次中継核であり梨状皮質(PC)に情報を伝える主嗅球(mOB)に対して単独または同時に電気刺激を行い、ICおよび周辺領域の応答変化について、ラット *in vivo* 標本を用いて光学計測を行い検討した。

CTを刺激した場合には無顆粒島皮質(AI)を除くICに、mOBを刺激した場合にはPCとAIの一部に反応が得られ、興奮伝播領域はほとんど重複しなかった。しかし、同時刺激を行うとAIに反応強度の有意な増加が認められた。また、吻側の不全顆粒島皮質(DI)では、同時刺激によってCT単独刺激時と比較して反応強度に有意な増加はなかったが、反応がピークに達する時間が早まった。更にCT刺激を基準にmOBを刺激するタイミングを前後させると、DIではCTを刺激した直後に反応強度のピークが生じるのに対し、AIではOB刺激直後にピークが認められた。

以上の結果から、DIは味覚、AIは嗅覚情報処理に主として関係する一方、IC内で嗅覚情報と味覚情報とが相互に反応を修飾していることが示唆された。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

The intracortical integration mechanism for information of odor and taste

○Mizoguchi N¹, Kobayashi M², Muramoto K¹

¹Div Physiol, Dept Human Dev Foster, Meikai Univ Sch Dent

²Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent

Flavor is important to feel a good taste of foods, and is formed mainly by integrating gustation with olfaction. However, it has been unclear how and where two kind of senses are integrated.

Our study is aimed at elucidating the mechanisms for integrating chemical senses to form flavor around the gustatory and olfactory cortices.

When a chorda tympanic nerve (CT) and/or main olfactory bulb (mOB) is stimulated electrically, we investigated the change in responses of the rat insular cortex (IC) and surrounding areas by *in vivo* optical imaging technique.

The CT stimulation evoked responses in the rostral part of the dysgranular IC (rDI), while the mOB stimulation evoked excitatory propagation that spread to the piriform cortex (PC) and a part of IC (AI). Simultaneous stimulation significantly increased the amplitude of responses in AI, and quickened a time to peak without increasing amplitude in rDI.

When the timing of mOB stimulation shifted before or after CT stimulation, the peak of response appeared after CT stimulation in rDI and immediately after mOB stimulation in AI.

These result suggest that the interaction between the DI and the AI play roles in signal processing and the integration of chemical senses with in the IC.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS14-5 嗅覚訓練マウスによる芳香成分の口臭マスキング作用の評価

○長田 和実

北医療大 歯 生理

【目的】 嗅覚のマスキングは多面的で、複雑なメカニズムにより生ずる。近年我々は Y 字型迷路 (Y-maze) を用いたマウスの嗅覚訓練パラダイムによる嗅覚マスキングの評価系を作成し (Chem Senses 36:137, 2011), 口臭成分の 1 つである dimethyl sulfide (DS) に対するモノテルペン類の嗅覚マスキング作用の定量的評価を行った (Chem Senses 38:57, 2013)。本発表では DS マスキング作用の構造-活性相関の結果と, trichloroanisole (TCA) の特異な嗅覚抑制作用について報告する。

【方法】 実験動物はにおいセンサーマウスとして C57BL/6j (♀: n=6) を用いた。DS のマスキング成分 (M) としてシトロネラルなどの 3,7-dimethyl monoterpene 類と, トリクロロアニソール (TCA) を用い, 嗅覚マスキング作用の検討を行った。23 時間絶水したマウスを Y-maze の長腕部末端に置き, 10 ppm DS 溶液およびその溶媒のみににおいを Y-maze の左右両側腕より同時に提示し, 正しいにおいを選択した場合, 報酬として一滴の水を与えた。左右両側腕のにおいを何回も入れ替え, 繰り返し実験し, DS の匂いの識別トレーニングを行った。次に般化試験として DS10ppm と様々な濃度の M を提示し, M の DS のマスキングの強度を定量的に測定した。

【結果と考察】 その結果, 1) 3,7-dimethyl monoterpene 類はその基本構造が類似しているにもかかわらず, マスキング指数 (MI) が 0.3~100 と活性に大きな違いがあった。2) きわめて低濃度の TCA 溶液 (1 mL) は 10ppmDS の匂いを有意に抑制し, この様な作用はテルペン類では見られなかった。また Y-maze 気相中の TCA の濃度も定量したのでその結果も併せて考察する。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Evaluation of the masking of dimethyl sulfide odors by food derived volatiles through the use of trained odor sensor mice

○Osada K

Div Physiol, Dept Oral Biol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Previous studies indicated that the mechanism of odor masking was multifaceted and complex, involving both the peripheral nervous system and the central nervous system. Recently, we demonstrated that the dimethyl sulfide (DS; a major chemical component of oral malodor) was masked by a couple of monoterpenes that produces an intense lemon aroma (Chem Senses 38:57, 2013). In this presentation, we show the structure-activity relationship of the odor masking effects of 3,7-dimethyl monoterpenes to the DS odor, and demonstrate the unique function of trichloroanisole diminishing the DS odor. Mice were trained in a Y maze to discriminate between DS (10 ppm in aqueous solution) and water. The mice were then confronted with the original choice of 10 ppm DS and water, but now in the presence of various concentrations of odor maskers. A series of generalization tests revealed that the mice failed to detect the odor of 10 ppm DS when confronted between 10 ppm (the strongest masker) or 3000 ppm (the weakest masker). Moreover, trichloroanisole diminished DS odor with very low concentration. This study is the first to show that food derived odorants can mask the odor of DS with various concentrations, altering the behavioral responses of trained odor sensor mice.

Conflict of Interest: The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

SS15-1 嚥下機能の理解から治療戦略へ

○井上 誠, 辻村 恭憲, 真柄 仁, 辻 光順

新潟大 院医歯 摂食嚥下リハビリ

日本では、超高齢者社会の延伸により要介護高齢者などの嚥下障害や肺炎発症数の増加が問題となっている。嚥下障害は、誤嚥や窒息を招き、ひいては低栄養、誤嚥性肺炎、それらに伴う死亡原因となるが、嚥下障害をもたらす原因疾患の多様性によりその病態像も様々であり、医療や介護の現場では、その理解がないままエビデンスをもたないまま臨床が進められている。嚥下障害の病態像は、大きく(1)唾液や分泌物の誤嚥と(2)食事時の食物誤嚥に分けられる。前者は、咽喉頭部の感覚低下が招く気道防御反射の破綻であり、後者は、脳血管疾患に伴う麻痺や頭頸部腫瘍術後の器質的障害をもたらす運動障害ととらえることができる。

我々は、今回、前者についての理解を深めるための実験を行った。すなわち、いかなる感覚刺激が嚥下反射誘発やその促進に有効であるかについて、生理学的手法を用いて検索した。嚥下反射をもたらす感覚刺激には、機械刺激や化学刺激がある。近年、嚥下反射の活性化に有効とされるTRP受容体への刺激に注目して、口腔・咽頭内にTRPV1やTRPM8をターゲットとした温度刺激、TRPV1をターゲットとした炭酸刺激を行った。その結果、TRPM8受容体の活性化を期待した温度刺激によって嚥下反射誘発は即時的な促進効果をもたらし、TRPV1受容体の活性化を期待した炭酸水刺激によって嚥下反射は刺激後60分後に促進効果をもたらした。炭酸水刺激が有効であったことから、咽頭部への電気刺激と炭酸水刺激の同時刺激効果を期待したが、電気刺激単独のものには及ばなかった。嚥下反射誘発やその促進に有効な末梢刺激の条件は未だ明らかとなっていない。今後、詳細な検討を継続する必要がある。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

From understanding mechanisms of swallowing to treatment strategy of dysphagia

○Inoue M, Tsujimura T, Magara J, Tsuji K

Div Dysphagia Rehabil, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Japanese population is aging year by year; more than 25% of total population is now over sixty-five years old. In Japan, one of the most common causes of death in elderly people is aspiration pneumonia caused by dysphagia, swallowing dysfunction. One of pathological problems of dysphagia is decline of swallowing initiation. We would like to introduce our study to understand which type of stimulation is effective to facilitate swallowing initiation. They include thermal and chemical stimulation as well as electrical stimulation. Thermal and chemical stimulation may be expected to activate TRP channels. Those ideas are based on the previous studies in which enhancing the sensory stimuli to activate those channels triggered the swallow response earlier.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS15-2 覚醒制御に関わる脳内生理活性物質の三叉神経中脳路核ニューロンおよび閉口筋運動ニューロンに対する影響

○井上 富雄, 中村 史朗, 中山希世美, 望月 文子, 清本 聖文

昭大 歯 口腔生理

覚醒制御に関わる視床下部のヒスタミンニューロンや縫線核のセロトニンニューロンは、運動系や感覚系を含めた脳内の多くのニューロンに軸索を送り興奮性の調節を行う。そこでまず、我々は三叉神経中脳路核 (MesV) ニューロンから咬筋運動ニューロン (MMN) に対する単シナプス性の出力に対するヒスタミン投与の影響を検討した。Wistar ラットの前頭断スライス標本上の MMN からホールセルパッチクランプ記録を行い、MesV ニューロンの軸索を電気刺激して MMN に誘発されたシナプス後電流 (PSCs) を指標に解析を行った。ヒスタミン投与と H1 受容体作動薬投与で PSCs の振幅は減少したが、H1 受容体拮抗薬の投与でヒスタミンの効果は抑制された。微弱電流による単線維刺激による PSCs は H1 受容体作動薬で発生確率が減少し、paired pulse ratio は H1 受容体作動薬の投与で増大した。以上の結果から、MesV から MMN へのシナプス入力、シナプス前終末に存在するヒスタミン H1 受容体の活性化により抑制されることが示唆された。次いで、MMN 樹状突起のグルタミン酸応答に対するセロトニン (5-HT) 投与の影響を解析した。Wistar ラットのスライス標本上の MMN からパッチクランプ記録を行い、灌流投与したケージドグルタミン酸をレーザー照射で解離して MMN に誘発されたグルタミン酸応答を指標に解析を行った。5-HT と 5-HT_{2A} 受容体刺激薬はグルタミン酸応答を増大したが、5-HT_{2A} 受容体拮抗薬は増大効果を抑制した。5-HT の増大効果は NMDA 受容体拮抗薬投与で消失したが、AMPA 受容体拮抗薬では残存した。以上の結果から、セロトニンは 5-HT_{2A} 受容体を介して NMDA 受容体機能を調節し MMN のグルタミン酸応答を増大することが示唆された。ヒスタミンとセロトニン入力は顎口腔の感覚と運動機能を変調すると考えられる。

【利益相反】 利益相反状態にありません。

Effects of histamine and serotonin on mesencephalic trigeminal neurons and jaw-closing motoneurons

○Inoue T, Nakamura S, Nakayama K, Mochiduki A, Kiyomoto M

Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent

Hypothalamic histaminergic neurons and raphe serotonergic neurons modulate activities of various neurons in the sensory and motor systems. In the present study, we examined the effects of histamine and serotonin (5-HT) on mesencephalic trigeminal (MesV) neurons and masseter motoneurons (MMNs). First, we examined the histaminergic modulation of the MesV stimulation evoked-PSCs in MMNs using whole-cell patch-clamp recording technique in rat brainstem slice preparations. Histamine inhibited the PSCs, which was mimicked by an H1 receptor agonist and blocked by the H1 receptor antagonist. The H1 receptor agonist increased the paired-pulse ratios and increased the failure rate of the monosynaptic PSCs. These results suggest that a presynaptic mechanism via H1 receptors is involved in the histaminergic inhibition of synaptic responses to MMNs from MesV afferents. Next, we examined the effects of serotonin on glutamate responses in the dendrites of MMNs evoked by laser uncaging of caged glutamate. 5-HT enhanced of the glutamate responses, which was mimicked by application of the 5-HT_{2A} receptor agonist and antagonized by the 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist. The 5-HT-induced enhancement was suppressed by NMDA receptor antagonist, but not by the AMPA receptor antagonist. These results suggest that histamine and 5-HT may affect motor responses in the jaw.

Conflict of Interest: The authors have declared that no competing interests exist.

SS15-3 咀嚼はどのような神経回路によって情動の影響を受けるのか

○吉田 篤, 佐藤 文彦, 加藤 隆史

阪大 院歯 口腔解剖 2

【背景と目的】三叉神経中脳路核 (Vmes) ニューロンは, 咀嚼筋紡錘に生ずる深部感覚を伝達する一次求心性ニューロンであり, 顎運動を含む頭頸部の運動の発現と制御にかかわっている. 顎運動が情動の影響を受けることは, 脳内に存在する Vmes ニューロンの細胞体が, 情動にかかわる上位脳からの入力を受ける可能性を示唆している. 我々は, 情動にかかわる前頭前皮質 (Pfc) および外側手綱核 (LHb) から Vmes への経路の様態と, この経路が情動の変化時に働くのかを検討した. 【方法】ラットを用い, ペントバルビタールとキシラジンの腹腔内投与による全身麻酔下で行った. 逆行性トレーサーである FG の Vmes への注入と, 順行性トレーサーである BDA の LHb への注入を行い, 直接投射の有無と投射ニューロンの分布様態を調べた. また, FG の Vmes への注入で標識される投射ニューロンが, 痛みまたはストレス負荷時に発現する, 活性化した細胞のマーカーである c-Fos 蛋白を持つかどうかを調べた. 【結果】Vmes に直接投射するニューロンが, 前頭前皮質 (その内側部と島皮質) および LHb 外側部に認められた. これら投射ニューロンのうち, 痛みまたはストレス負荷時に c-Fos 蛋白を発現するものが存在した. 【考察】本研究によって, 情動にかかわる上位脳から Vmes ニューロンへの直接回路が存在し, この回路が情動の変化時に確かに働いており, 顎運動を制御している可能性が示された.

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する.

By what neuronal pathways do emotions affect mastication?

○Yoshida A, Sato F, Kato T

Dept Oral Anat Neurobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Trigeminal mesencephalic nucleus (Vmes) neurons convey proprioception from the masticatory muscle spindles to the supratrigeminal nucleus (Vsup) and play a crucial role in mastication. The neuronal cell body of Vmes neurons in the brain possibly receives inputs from the emotion-related brain structures, suggesting the mastication can be affected by the emotional state. We examined how the prefrontal cortex (Pfc) and lateral habenula (LHb) project to the Vmes and affect the Vmes neurons. We used rats anaesthetized with pentobarbital and xylazine. After injections of a retrograde tracer, FG, into the Vmes, projection neurons were labeled in the Pfc and lateral part of LHb (Lhbl). After injections of an anterograde tracer, BDA, in the Pfc and Lhbl, the labeled terminals were found in the Vmes, and some of them contacted the cell bodies of Vmes neurons. After FG injections into the Vmes, stress stimuli were also added to the rats. Some of the projection neurons in the Pfc and Lhbl showed immuno-positive to c-Fos protein. These findings showed that there exist direct projections from the Pfc and Lhbl to the Vmes neurons, and the projections possibly function under stressful conditions.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS15-4 三叉神経系における痛覚伝達経路および中枢からの下行性制御について

○後藤 哲哉, 倉本恵梨子, 岩井 治樹

鹿大 院医歯 機能形態

三叉神経による痛覚伝達ならびに痛覚抑制については様々な研究がなされているが、まだ解明されていない部分も多い。我々が痛覚伝達経路に関して現在注目しているのは、三叉神経節における上顎神経と下顎神経との相互作用である。上顎神経が侵害刺激を受けると、三叉神経節において刺激を受けた上顎神経のみならず下顎神経も神経ペプチドの産生が活性化することが知られているが、どのようなメカニズムかは明らかになっていない。我々は、神経細胞が小胞体トランスポーターを使って放出するATPに着目し、刺激を受けた神経細胞から、神経細胞-サテライトグリア細胞-ミクログリア様細胞、へとATPによってシグナルが伝わって順に活性化され、三叉神経節内で異所性疼痛を引き起こしている可能性を見いだした。

一方、大脳皮質からの痛覚抑制経路としては、大脳皮質運動野からの中脳水道周囲灰白質を介する疼痛抑制系が提唱されている。実際、激しい運動をしている時は少々のかげをしたとしてもあまり痛みを感じないことは経験的に知られている。しかしながら、運動と痛覚抑制がどのような神経回路になっているのかは明らかではなかった。最近、我々はラット大脳皮質・眼窩野に逆行性神経トレーサーを注入した実験により、大脳皮質運動野-眼窩野の経路があることを見いだした。眼窩野と中脳水道周囲灰白質間の経路はすでに示唆されているので、大脳皮質運動野-前頭前野（眼窩野または帯状回）-中脳水道周囲灰白質、の神経経路がある事が示唆された。中脳水道周囲灰白質は疼痛抑制のみならず、闘争や逃走、すくみ反応など、動物のさまざまな防御反応に関わるとされている領域であるので、運動、疼痛抑制、および防御反応間の関連が明らかにされることが期待される。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

The pain pathway in the trigeminal nerve system, and the descending pain control by the cerebral motor cortex

○Goto T, Kuramoto E, Iwai H

Dept Oral Anat Cell Biol, Grad Sch Med Dent Sci, Kagoshima Univ

Various studies were performed to investigate in terms of the pain pathways by the trigeminal nerve. We now focused on the interaction of the maxillary nerve and the mandibular nerve in the trigeminal ganglia. When maxillary nerve is subjected to noxious stimuli, the production of neuropeptides was occurred in the mandibular nerve as well as in maxillary nerve. We examined the ATP to release with the vesicle transporter, we found “nerve cell – satellite glial cell – microglial-like cells” system that would causes the ectopic pain.

Regarding with the antinociception path from the cerebral cortex, the pain inhibitory system via periaqueductal gray from the motor cortex has been proposed. Recently, using retrograde nerve tracer, we found the motor cortex has a path to orbital cortex. Since the path between the orbital cortex and periaqueductal gray has already been shown, “the motor cortex – the prefrontal cortex (orbital cortex or cingulate gyrus) – periaqueductal gray matter”, pathway was supposed to be existed. As periaqueductal gray matter is involved in the pain suppression, as well as in struggle, flight, the region would be implicated in a variety of defensive reactions.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS15-5 三叉神経障害による異所性痛覚過敏へのグリアの関与

○岩田 幸一, 篠田 雅路, 片桐 綾乃

日大 歯 生理

三叉神経の傷害や口腔顔面領域に炎症が起こされると、しばしば口腔顔面領域に強い慢性痛が引き起こされる。このような神経損傷や炎症によって引き起こされる経過の長い慢性痛は原因が複雑であることから、そのメカニズムが明らかにされていないために適切な治療法が確立されておらず、治療に苦慮する場合が多い。これまでに我々は様々な慢性痛モデル動物を用いて、将来的な臨床応用を視野に入れた慢性痛の神経機構に関する基礎研究を推進している。末梢神経傷害や慢性の炎症などの病的状態下では末梢神経活動の異常興奮が引き起こされる。この神経興奮の亢進は神経節細胞における様々な分子の合成系に作用し、末梢神経系の感作を誘導し、興奮性をさらに高める。このような末梢神経系の過興奮は中枢神経系に伝えられ、中枢神経系に存在するニューロンの興奮性の増加を誘導する。中枢神経系では神経の興奮と同時に、様々な分子の合成系も変化し、中神経系の活動性はさらに更新する。同時に、中枢神経系ではニューロンの活動性増加だけでなくグリア細胞の活性化も誘導される。脊髄や延髄をはじめとする中枢神経系にはミクログリアやアストログリアあるいはオリゴデンドログリアと呼ばれるグリア細胞が存在し、ニューロンの栄養や支持細胞として機能していることが知られている。しかし、最近の知見でこれらのグリア細胞は様々なメカニズムでニューロンの興奮性調節に関与することが明らかにされつつある。特にミクログリアとアストログリアは末梢神経損傷や炎症によって活性化し様々な物質を放出し、ニューロンの活動性変調に関与することが報告されている。本シンポジウムではニューロンとグリア細胞の機能連関に関する最近の知見を紹介し、口腔顔面領域に引き起こされる異所性痛覚過敏の発症機構についてディスカッションしたい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Glial cell involvement in extraterritorial pain associated with trigeminal nerve injury

○Iwata K, Shinoda M, Katagiri A

Dept Physiol, Sch Dent, Nihon Univ

Extraterritorial orofacial neuropathic pain frequently occurs following trigeminal nerve injury or inflammation in orofacial regions. It's hard to treat these patients because its underlying mechanism is still unknown. Following trigeminal nerve injury or orofacial inflammation, a barrage of action potentials is generated in the primary afferent neurons, and those high-frequency action potentials come up to the trigeminal spinal subnucleus caudalis (Vc) and upper cervical spinal cord (C1-C2) neurons. Vc and C1-C2 neurons then become hyperexcitable, and high-frequency action potentials are also generated in Vc and C1-C2 neurons. Microglial and astroglial cells in the broad areas of the Vc and C1-C2 are also activated following hyperactivation of Vc and C1-C2 neurons. We observed that a blockade of microglial and astroglial cell activation in Vc and C1-C2 eliminated extraterritorial orofacial neuropathic pain conditions, suggesting that neuron-glia cell interaction has a pivotal role in developing extraterritorial orofacial neuropathic pain associated with trigeminal nerve injury or orofacial inflammation. In this symposium, I will show you recent our data regarding the involvement of neuron-glia cell interaction in extraterritorial orofacial pain, and discuss mechanisms underlying extraterritorial orofacial neuropathic pain.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

SS16-1 歯周治療の重要性と困難性

○三谷 章雄, 菊池 毅

愛院大 歯 歯周病

歯周病は成人の8割が罹患する多因子性疾患であり、多くの場合慢性的に移行する。また、自覚症状が少なく治療の必要性があったとしても治療を受けていない患者が多いことが非常に高い有病率の理由として挙げられる。

また、我が国は世界でも類を見ない超高齢社会に突入している。この高齢化率は上昇傾向に在り、2060年には約40%に達すると見られている。平均寿命の延伸によって、感染症を起こしやすい高齢者の急増が社会の新たな問題として重要視されている。歯周病は歯周病原菌による口腔感染症ではあるが、近年の研究により、全身の健康にも影響する事が明らかとなっている。歯周治療は糖尿病、肺炎、心血管疾患、関節リウマチなどの疾患群のリスク低下に寄与すると考えられている。これら疾患群は高齢者の自立度を低下させるものであり、歯周治療は全身的な疾患リスクを低減し、全身の健康に寄与する可能性がある。現在、厚労省は運動や食習慣などを改善することで、健康寿命を1.6年以上伸ばすことを提案しているが、このような目標を達成するためには、しっかりした歯周治療を行う事が重要である。しかしながら、我々の研究からも現行の歯周組織再生療法を駆使しても歯周病改善には限界がある。そこで、新たな歯周治療法、特に重篤な歯周病への再生療法の開発が強く求められている。

【利益相反】 本発表に関連し著者は開示すべき利益相反がないことを宣言する。

The importance and difficulty of the periodontal treatment

○Mitani A, Kikuchi T

Dept Periodontol, Sch Dent, Aichi-Gakuin Univ

Periodontal disease is thought to be a multifactorial disease, and progress chronically in many cases. That frequency is more than 80% of adults, because periodontal disease has usually less subjective symptoms and thus the patients are often not receiving treatment in spite of the needs for periodontal treatment.

In addition, our country has been plunged into one of the leading super-aged society in the world. The aging rate is at the upward trend, and is believed to reach about 40% in 2060. By extension of the average life expectancy, the sharp increase in elderly who is susceptible to infections is emphasized as a new problem of Japanese society. Recent researches have been revealed that periodontitis is not only an oral infection by periodontal pathogen but also could affect the health of whole body. Periodontal treatment is thought to contribute to risk reduction for systemic diseases such as diabetes, pneumonia, cardiovascular disease, and rheumatoid arthritis. These systemic diseases lead to independence reduction of the elderly, and the periodontal treatment could contribute to systemic health through the risk reduction of the systemic diseases. Currently, the Ministry of Health, Labour and Welfare propose the extension of the healthy life expectancy more than 1.6-year by the exercise and/or improving eating habits. In order to achieve that goal, it is necessary to practice of serious periodontal treatment. However, from our research, there is a limitation in the improvement of periodontal disease even when applying the current regenerative therapy. Thus, the development of a newly periodontal treatment, in particular a regenerative therapy for the severe periodontal disease, is strongly demanded.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS16-2 これまでの歯周組織再生療法の課題

○小方 頼昌

日大松戸歯 歯周治療

病的歯根面に新生セメント質が新生され、歯根膜が形成されて生じる結合組織性付着を新付着と言ひ、新付着による再生は、歯周組織再生療法のゴールである。歯周組織再生療法には、物理的に細胞の動きを制御する方法と、生物学的に細胞増殖や分化を制御することで歯周組織の再生を誘導する方法が存在する。前者は、組織誘導膜（メンブレン）を使用する guided tissue regeneration (GTR) 法で、日本で健康保険に導入されている。後者には数種類の方法があるが、先進医療として認可されているエナメルマトリックスタンパク質（エムドゲイン®ゲル：バイオリジェネレーション法）、米国で認可を受けた血小板由来成長因子（PDGF-BB および β -TCP: 商品名 GEM21S）、日本で臨床治験が実施され、近い将来の承認が期待される塩基性線維芽細胞成長因子（FGF2）を使用した再生療法等がある。適応は、中等度～重度慢性歯周炎（侵襲性歯周炎）患者の、2壁～3壁性垂直性骨欠損およびリンデの根分岐部病変1～2度部位であるが、重症度が高い水平性骨吸収や反対側まで貫通した根分岐部病変等の再生は非常に困難である。また、骨欠損幅や深さが大きい場合は、移植材等の併用が必要な場合が多く、外科手術のテクニックも要求される。そのため、従来の歯周組織再生療法の適応を超える術式や、患者自身の細胞を使用した細胞治療が歯周組織再生療法に応用できれば、多くの歯周病変が治療可能になると考えられる。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Challenge for the novel therapeutics of periodontal regeneration

○Ogata Y

Dept Periodontol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

New attachment with periodontal regeneration is the ideal goal of therapy because it results in reconstruction of the periodontal tissue. Guided tissue regeneration (GTR) consists of placing barriers membrane to cover the bone and periodontal ligament, thus temporarily separating them from gingival epithelium. Enamel matrix proteins are secreted by Hertwig's epithelial root sheath during tooth development and induce acellular cementum formation and periodontal regeneration. Several growth factors (platelet derived growth factor, basic fibroblast growth factor etc.) are also used for the purpose of periodontal regeneration. However, adaptive cases for periodontal regeneration therapy are restricted. Therefore, new technology using stem cells for periodontal regeneration is highly anticipated.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS16-3 自己脂肪組織由来多系統前駆細胞移植による歯周組織再生療法の開発

○竹立 匡秀¹, 沢田 啓吾¹, 李 千萬², 岩山 智明¹, 山本 智美¹, 森本 千晶¹,
平井 麻絵¹, 佐野 夕子¹, 松山 晃文³, 大倉 華雪³, 北村 正博¹, 村上 伸也¹

¹阪大 院歯 口腔治療

²阪大 院医 未来医療開発

³医薬基盤・健康・栄養研 難治性疾患治療開発・支援

現在臨床応用されている歯周組織再生療法は、いずれも歯周組織、特に歯根膜に内在する幹細胞のもつ組織修復力を活性化することにより歯周組織の再生を図る治療法である。加齢に伴う同幹細胞数の減少や歯周病の進行に伴う歯根膜の破壊等により、歯根膜内の幹細胞の活用が十分に期待できない場合には、上記の歯周組織再生療法はその再生誘導効果を十分に発揮するに至らない。そこで、歯周組織欠損部に他組織より採取した間葉系幹細胞を移植することにより、歯周組織再生を促す治療法の開発が進められている。

我々の研究室では、採取に際して患者への負担が比較的少なく、安全性も高いと考えられる脂肪組織中に存在する未分化間葉系幹細胞（脂肪組織由来多系統前駆細胞 Adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cell: ADMPC）に着目し、ADMPC 移植による歯周組織再生誘導効果について検討を重ねてきた。そして我々は、ビーグル犬の実験的歯周病モデルを用いて、自己由来 ADMPC をフィブリンゲルを基材として歯周組織欠損部に移植することにより歯周組織の再生が誘導されることを明らかにした。

その成果に基づき、現在、大阪大学歯学部附属病院にて臨床研究を実施している。同臨床研究は、被験者の腹部皮下脂肪組織を採取し、ADMPC を単離、培養した後、生体接着剤として臨床応用されているフィブリン製剤を基材とし、歯周組織欠損部に移植するものである。プライマリーエンドポイントは当該治療の安全性、セカンダリーエンドポイントは当該治療の有効性とし、移植後 36 週まで観察を継続する。これまで ADMPC 移植を行った被験者では、ADMPC 移植による歯周組織再生効果が認められた一方で、移植に関連すると考えられる有害事象は観察されていない。

本講演では、ADMPC 移植による歯周組織再生療法開発の現状について報告するとともに、歯周組織再生分野における幹細胞治療の将来展望につき議論したい。

【利益相反】 著者は利益相反がないことを宣言する。

Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cell

○Takedachi M¹, Sawada K¹, Lee CM², Iwayama T¹, Yamamoto S¹, Morimoto C¹, Hirai A¹,
Sano Y¹, Matsuyama A³, Okura H³, Kitamura M¹, Murakami S¹

¹Osaka Univ Grad Sch Dent, Dept Periodontol

²Osaka Univ Grad Sch Med, Dept Med Innov

³Natl Inst Biomed Innov, Health Nutr, Res on Dis Bioresources, Platform of Therapeut for Rare Dis

The complete regeneration of periodontal tissue destroyed by periodontal diseases is an ideal goal of periodontal therapy. Due to unsatisfied efficacy of current periodontal regenerative therapies, developing new cell-based therapies has been hoped for.

We have revealed the efficacy of transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells (ADMPCs) for periodontal regeneration by using experimental periodontitis models of beagle dogs. The safety and efficacy of this new periodontal regenerative therapy is currently under investigation in the First-in-Man clinical study at Osaka University Dental Hospital. So far, autologous transplantation of ADMPCs resulted in regeneration of tooth-supporting alveolar bone and no transplantation-related adverse events were observed.

In this symposium, we would like to present our results obtained from clinical study and share a prospective view of stem cell-based therapy for periodontal regeneration.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

SS16-4 自家細胞を用いた再生医療の普及への課題

○畠 賢一郎

(株) ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

われわれは再生医療の普及を目指す目的で1999年にベンチャー企業を起し、自家細胞を用いた再生医療製品の開発を行ってきた。その結果、2007年10月にわが国初の生細胞組込型再生医療製品である自家培養表皮『ジェイス®』の製造販売承認を厚生労働省から受けた。さらに2009年に保険収載の後、広範囲重傷熱傷患者を対象にこれを提供してきた。現在までに7年以上を経ており、製造行為としての細胞培養ならびにそれを用いた医療を通じてさまざまな経験をした。加えて2012年には本邦で2番目となる自家培養軟骨『ジャック®』の承認を受け、同様に2013年から保険収載のもと医療機関に提供を行ってきた。これら両製品ともに開発段階の困難さに加え、製造工程管理ならびに移植方法標準化とその情報提供については、事業開始以前に想定していた内容をこえて工夫を要した。生きた細胞を使った再生医療の製品の産業化は、通常の医薬品や医療機器などとは違った対応をとらなくてはならないことも知った。

自家細胞を用いた再生医療製品の製造および販売について本格的に考えると、いままでみなかった多くの課題に直面する。それらの多くは、提供すべき患者自身の細胞を「いわゆる」製品として提供するために生じるものである。産業化へのプロセスからみた自家細胞の製品は、大量生産ができないデメリットに加え、これら課題を解決する必要がある。

本口演では、われわれが経験してきた皮膚ならびに軟骨の再生医療について、その現状と課題をご説明したい。さらに、昨年施行された新しい制度と共に、今後、歯科医療にもたらす影響、ならびにこれらが普及するために必要な事項について解説したいと考えている。

【利益相反】 著者は、所属企業に関連する内容以外の利益相反がないことを宣言する。

Challenge for development of regenerative medicinal products using autologous cells

○Hata K

Japan Tissue Engineering Co., Ltd.

We have established a venture company in 1999 to achieve the industrialization of regenerative medicine, and developed regenerative medicinal products using autologous cells. Through our activity, we have obtained marketing authorization of autologous cultured epidermis, JACE, in 2007 as a first tissue engineered product for the treatment of severe burn patient in Japan. Also, it has been listed as a reimbursement item on our national health insurance system. We have vast experience as a manufacturer in providing tissue engineered products to medical institutions. In 2012, the second product, autologous cultured cartilage, JACC, for treatment of knee joint cartilage defects, received marketing authorization.

On the view of production and sales management, there are many difficulties in autologous cell providing business. It is not suitable for mass production, and the challenges are that the patient tissue/cells are not all equal, and the quality control is not easy. These challenges must be cleared toward industrialization.

In my presentation, I would like to explain about our experience about providing autologous cell products, and show the overview about the influence of regenerative medicine on the dental fields.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript except belonging company.

SS16-5 歯科における再生医療普及のためのプラットフォーム整備の重要性

○飛田 護邦

順天堂大 医 形成外科

再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律（平成 25 年法律第 13 号）が平成 25 年 5 月に公布、施行され、再生医療を国民が迅速かつ安全に受けることを可能とするための基本理念を定めるとともに、国が法制上の措置等による対応を講じることが明記された。この法律をもとに、平成 26 年 11 月に再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成 25 年法律第 85 号、以下「再生医療等安全性確保法」という。）と、薬事法等の一部を改正する法律が施行された。再生医療等安全性確保法で定められる再生医療等技術とは、人の身体の構造又は機能の再建、修復又は形成、又は人の疾病の治療又は予防を目的として細胞加工物を用いるものであり、臨床研究だけでなく自由診療として実施されている再生医療等技術も本法に含まれる。

歯科においては、現在、多血小板血漿治療やその類似の技術が、創傷治癒促進などを目的に自由診療として提供されているが、今後は、培養細胞等を応用した医療技術が、研究開発を経て、歯科再生医療として普及することが予想される。そこで、今回、歯科において、培養細胞等を応用した再生医療を適切に普及させていくための方策を考察する。

【利益相反】 利益相反事項はありません。

Importance of the platform system for the regenerative medicine popularization in dentistry

○Tobita M

Dept Plast Reconstr Surg, Juntendo Univ Sch Med

Regenerative Medicine Promotion Act was promulgated and came into force in 2013. Based on this institutional framework, the Act on the Safety of Regenerative Medicine was passed approved by Japanese Diet in November 2013, and came into force in 25th November 2014. The Act on the Safety of Regenerative Medicine covers cell therapies those safety and efficacy have not been established and purpose of therapy is classified as one of the followings: (1) technologies intended for reconstruction, repair, or formation of structure or functions of the human body or (2) those intended for treatment or prevention of human diseases by use of processed cells. The Act on the Safety of Regenerative Medicine will be applied not only to clinical trials but also cell therapies administered in private practice outside of national health insurance.

In a private practice of dental area, although platelet-rich plasma is one of typical regenerative medicine currently, some of regenerative medicine with cultured cells will probably diffused via clinical studies in the future. This presentation looks into the appropriate way to diffuse regenerative medicine with cultured cells.

Conflict of Interest: No potential conflicts of interest were disclosed.

O1-C1 Osteoprotegerin による腸管上皮 M 細胞の分化抑制機構とその意義

○木村 俊介¹, 武藤 麻未², 岩永 敏彦¹

¹北大 院医

²北大 院歯 矯正

外界とつながる腸管には粘膜免疫機構が発達している。腸管パイエル板に代表される集合リンパ小節は管腔内抗原の監視, 抗体産生, 免疫細胞活性化を調節することで粘膜免疫応答を制御する器官である。パイエル板濾胞上皮には Microfold 細胞 (M 細胞) が存在し, 管腔内の物質を取込み上皮下の免疫担当細胞へと受け渡すことで, 粘膜免疫応答の開始に働く。M 細胞表面は糖衣が薄く疎な微小突起で覆われ, 高分子の接触を許容する。この M 細胞の特徴は免疫監視には有用であるが, その分バリア機構が脆弱で異物や微生物の侵入が容易な細胞とみなすことができる。そのため, M 細胞は濾胞上皮に限局し, その数も厳密に制御されていると考えられる。RANKL-RANK シグナルは M 細胞分化を誘導する。受容体 RANK は腸管上皮に発現し, RANKL を濾胞上皮下のストローマ細胞が発現することで, M 細胞の出現は濾胞上皮に制限される。我々は RANKL-RANK シグナルを抑制する Osteoprotegerin (OPG) を M 細胞が発現し, その欠損によって M 細胞の異常な増加が起こることを見出した。腸管における OPG の発現分布を詳細に解析すると, M 細胞の他に腸上皮内分泌細胞が OPG を発現していた。腸上皮における OPG の発現は M 細胞の過剰な増殖を抑え, バリア機構の維持に働くと想定される。本演題では腸上皮における RANKL-RANK-OPG による恒常性維持機構, ならびに, その破綻と疾患との関連について考察する。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Osteoprotegerin regulates the differentiation of Peyer's patch M cell

○Kimura S¹, Mutoh M², Iwanaga T¹

¹Div Histo. & Cyto, Hokkaido Univ Grad Sch Med

²Dept Orthodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

The microfold (M) cell residing in the follicle-associated epithelium is a specialized epithelial cell that initiates mucosal immune responses by sampling antigens across the epithelial barrier from the gut lumen to immune cells. M cells have a thinner glycocalyx, which allows them to have easy access to luminal antigens, while which also enables the pathogen to bind and invade our body. Increase in the number of M cells thus may cause breakdown in the epithelial barrier functions and should be strictly controlled. Here, we showed osteoprotegerin (OPG) is expressed by M cells in the FAE of Peyer's patch and enteroendocrine cells. OPG released from M cells suppresses the increase in the number of M cells in the FAE of Peyer's patch. Our study revealed that OPG regulates the number of M cells in the gut, which may contribute to maintaining the homeostasis of the intestinal epithelial barrier functions.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C2 CXCL4 は新規 Ni 結合タンパク質であり Ni アレルギーを増強する

○黒石 智誠¹, 田中 志典^{1,2}, 遠藤 康男¹, 菅原 俊二¹

¹東北大 院歯 口腔分子制御

²東北大 院歯 小児歯

ニッケル (Ni) はパッチテストにおける陽性率の高さなどから、最も重要視される金属アレルギーである。Ni イオンはハプテンとして機能し、生体内では何らかの自己タンパク質に結合すると考えられている。しかしながら、この Ni 結合性タンパク質が Ni アレルギーの病因論にどの様に関与するかは明らかでない。これまで我々は、グラム陰性菌細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) が、Ni アレルギーの感作相および惹起相のいずれにおいても有効なアジュバントとして機能することを報告してきた。LPS は様々な炎症メディエーターを誘導することから、今回我々は、「Ni 結合性タンパク質も LPS によって誘導されるのではないか」との仮説に基づき本研究を行った。まず、LPS 投与マウス由来血清 (LPS-serum) による Ni アレルギーの増強効果を検討した。それ自体では炎症を惹起することができない低濃度の Ni と LPS-serum を Ni 感作マウスの耳介に皮内投与すると、有意な Ni アレルギー性炎症 (耳介の腫脹) の増強が認められた。これに対して、コントロールである生理食塩水投与マウス由来血清では炎症の増強は認められなかった。そこで、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて LPS-serum を精製すると、Ni 結合画分に Ni アレルギー性炎症を増強する活性が認められた。Ni 結合画分をさらに精製し、質量分析装置によるタンパク質の同定を行った結果、活性画分から CXCL4 が検出された。Ni レジンを用いたパッチ法および表面プラズモン共鳴装置を用いた解析から、CXCL4 と Ni イオンの直接結合が示された。さらに、低濃度 Ni と CXCL4 を同時に皮内投与することにより、Ni アレルギー性炎症が有意に増強された。以上の結果から、CXCL4 は新規 Ni 結合タンパク質であり、Ni アレルギーを増強することが明らかとなった。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

CXCL4 is a novel nickel binding protein and augments nickel allergy

○Kuroishi T¹, Tanaka Y^{1,2}, Endo Y¹, Sugawara S¹

¹Div Oral Immunol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Among various metals, nickel (Ni) is the most frequent metal allergen. Ni ion is considered to bind to endogenous proteins. However, it has not been clarified whether these Ni-binding proteins are involved with the pathogenesis of Ni-allergy. We previously reported that lipopolysaccharide (LPS) functions as an effective adjuvant at both sensitization and elicitation phases of murine Ni-allergy model. Because LPS induces a variety of inflammatory mediators, we hypothesized that LPS induces Ni-binding protein(s). To verify this hypothesis, we first examined augmentable effects of serum taken from LPS-injected mice (LPS serum) on Ni-allergy. LPS serum, but not serum taken from saline-injected mice, augments ear swelling when injected intradermally with Ni in ear pinnae of Ni-sensitized mouse. When LPS serum was applied to Ni-affinity column chromatography, the augmentable effect was detected in Ni-binding fraction. Ni-binding fraction was further purified, and CXCL4 was detected in the active fraction by tandem mass spectrometric analysis. Batch analysis with Ni-resin and surface plasmon resonance analysis revealed a direct binding between CXCL4 and Ni ion. rCXCL4 also augmented Ni-allergic inflammation at elicitation phase, but not sensitization phase. These results indicated that CXCL4 is a novel Ni-binding protein and augments Ni-allergy.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C3 マウス唾液腺樹状細胞の同定とその免疫学的特徴の解析

○陸 路^{1,2}, 田中 志典^{2,3}, 菅原 俊二²¹東北大 院歯 口診²東北大 院歯 口腔分子制御³東北大 院歯 小児歯

【目的】口腔や腸管などの各粘膜免疫系が相互作用することにより構築される全身の粘膜免疫システムは共通粘膜免疫システムと呼ばれている。唾液腺も分泌型 IgA を産生することなどにより、口腔領域における共通粘膜免疫システムの一翼を担っている。唾液腺には多様な免疫担当細胞が存在するが、抗原提示細胞、特に樹状細胞は同定されていない。本研究は、唾液腺樹状細胞を同定し、その分化・成熟経路と免疫学的特徴について解析することを目的とした。【方法】マウス顎下腺から酵素処理により浮遊細胞を調製し、フローサイトメトリー解析を行った。また、樹状細胞特異的増殖因子である Flt3 ligand (Flt3L) により誘導される細胞増殖と樹状細胞共通前駆細胞 (common dendritic cell precursor, CDP) 移入試験により、唾液腺樹状細胞の分化・成熟経路を解析した。さらに、卵白アルブミン特異的 OT-I ナイーブ CD8⁺ T 細胞と抗原提示細胞を共培養することにより、クロスプレゼンテーション能を解析した。【結果】顎下腺細胞のフローサイトメトリー解析から、CD45⁺ MHC class II⁺ CD64⁺ マクロファージと CD45⁺ MHC class II⁺ CD11c⁺ 樹状細胞の 2 種類の抗原提示細胞が同定され、唾液腺樹状細胞は CD103⁺ と CD11b⁺ に分類された。また、唾液腺樹状細胞は Flt3L 依存性に増殖し、CDP より分化することが明らかになった。さらに、CD103⁺ 唾液腺樹状細胞はクロスプレゼンテーション能を持つことが明らかとなった。【考察】本研究の結果から、マウス顎下腺には少なくとも 2 種類の樹状細胞が常在しており、唾液腺における免疫応答の制御に関与していることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Identification and characterization of dendritic cells in murine salivary glands

○Lu L^{1,2}, Tanaka Y^{2,3}, Sugawara S²¹Div Oral Diag, Tohoku Univ Grad Sch Dent²Div Oral Immunol, Tohoku Univ Grad Sch Dent³Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Purpose: Various immunocompetent cells reside in salivary glands. However, it is still unclear whether antigen-presenting cells (APCs), especially dendritic cells (DCs), reside in salivary glands or not. In this study, we attempted to identify and characterize the DCs in murine submandibular gland (SMG). **Methods:** Single cell suspensions were prepared from murine SMG by enzymatic digestion and analyzed by flow cytometry. Proliferation and origin of APCs were analyzed by Flt3 ligand (Flt3L)-induced proliferation assay and common dendritic cell precursor (CDP) transfer assay. Flt3L is a specific growth factor for DCs. For in vitro cross-presentation assay, ovalbumin-pulsed APCs were co-cultured with ovalbumin-specific OT-I naïve CD8⁺ T cells. **Results:** Flow cytometric analysis revealed that there are two kinds of SMG APCs, CD45⁺ MHC class II⁺ CD64⁺ macrophages and CD45⁺ MHC class II⁺ CD11c⁺ DCs. SMG DCs were further classified into CD103⁺ and CD11b⁺. SMG DCs proliferated dependently on Flt3L and were derived from CDP. CD103⁺ SMG DCs showed cross-presentation activity. **Conclusion:** We identified at least two kinds of SMG DCs, CD103⁺ and CD11b⁺. These results indicated that the DCs may contribute immune responses in salivary glands.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C4 口腔粘膜炎症において局所に集積する T 細胞の解析

○Hirunwidchayarat Worawalun, 大野 建州, Kang Siwen, 永井 重徳, 東 みゆき
医科歯科大 院医歯 分子免疫

Analyses of locally recruiting T cells in the oral mucosa inflammation

○Hirunwidchayarat W, Ohno T, Kang SW, Nagai S, Azuma M
Div Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

[Purpose] The oral mucosa is a type II mucosal surface covered by a stratified squamous epithelium, which share many features with the skin. The oral mucosa also functions as a protective barrier against harmful environmental stimuli. It has been believed that oral mucosa is more resistant to inflammatory stimuli and recovers quickly from inflammatory change as compared with the skin. However the regulatory mechanisms have not been clarified yet. In this study, we have established a murine model of hapten-induced oral mucosal inflammation and examined histological changes and recruitment of T cells in the local tissues and the secondary lymphoid tissues. **[Methods]** DNFB was painted onto the shaved abdominal skin for sensitization and then 0.2% DNFB was topically applied onto the ear skin (ES) or the buccal mucosa (BM) for challenge. Histological changes in the local tissues and lymphocyte status in the ES, BM, regional lymph node (RLN), and spleens after the challenge were analyzed. **[Results and Discussion]** At 10h after BM challenge, the thickened epithelium, disarrangement of basal cells, and infiltration of mononuclear cells under the epithelium were observed. At 24h, more severe damage of most epithelium layers and basement membrane with abundant infiltration was observed. Despite the severe damages of epithelium, epithelial layer started to recover at 36h and the thickness returned to the normal level at 72h. In contrast, the swelling of ES continued during 24-48 hrs. At 24h after challenge, total cell numbers in the RLN and spleens increased, however, the ratios of CD3⁺ T cells decreased and reciprocally local tissue-recruiting CD3⁺ T cells increased. They showed CD62L⁻CD44^{high} effector memory phenotype. Although tissue recruiting CD8⁺ T cells expressed much higher levels of IFN- γ , BM-recruiting CD8⁺ T cells expressed lower percentages of IFN- γ , suggesting impaired activation of CD8⁺ T cells in the BM. BM challenge induced a lower ratio of IFN- γ ⁺ splenic CD4⁺ T cells and higher ratio of Foxp3⁺ regulatory T cells in the RLN, suggesting impaired activation of CD4⁺ T cells in the BM. Our results suggest that the BM-recruiting T cells was abundant, but their activation status was regulated as compared to the skin-recruiting T cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C5 Tr1 分化における PI3 の役割

○Niken Adiba Nadya, 東 みゆき, 永井 重徳
医科歯科大 院医歯 分子免疫

Role of PI3K in Tr1 cells differentiation

○Niken A, Azuma M, Nagai S

Div Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

[**Purpose**] IL-10 producing type I regulatory T (Tr1) cell is one of the helper T (Th) subsets that has strong immunosuppressive properties and helps to control excessive inflammatory responses such as tissue inflammation or autoimmunity. Therefore, it is important to clarify the molecular mechanism of Tr1 differentiation for the regulation of the inflammatory responses, but it has not characterized yet. In this time, we investigated the signaling pathway related to Tr1 differentiation, especially focus on the role of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), a lipid kinase that generates phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) to transduce the cell activity such as translation or cell survival, including immune cells. [**Materials & Methods**] CD25⁺ naturally occurring regulatory T (nTreg)-depleted conventional CD4⁺ T cells were isolated from BALB/c WT mice and stimulated with anti-CD3 ϵ and anti-CD28 Abs adding IL-27 in the presence or absence of PI3K inhibitors. After 3 days of incubation, the ratio of IL-10-producing cells was measured by FACS. [**Results & Conclusion**] The differentiation of Tr1 cells was inhibited by PI3K inhibitors in a dose dependent manner only when we added the inhibitors on day 0, indicating that the activation of PI3K signaling pathway in the priming phase is required for Tr1 differentiation. We further examine the involvement of several molecules downstream of PI3K pathway on the differentiation of Tr1 cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C6 IL-12 と IL-18 は抗原非依存的にヒト V γ 9V δ 2 T 細胞を活性化する

○堂前 英資¹, 合田 征司², 吉川 美弘¹, 鎌田 愛子¹, 池尾 隆¹

¹大歯大 生化

²神歯大 院歯 口腔科学

V γ 9V δ 2 T 細胞はヒト末梢血中の $\gamma\delta$ T 細胞の主要なサブセットで、リン酸抗原に反応し活性化されることは知られているが、サイトカインによる活性化についてはあまり知られていない。本研究でわれわれは、V γ 9V δ 2 T 細胞の IL-12 と IL-18 による活性化と、その分子メカニズムについて検討した。IL-12 と IL-18 による共刺激は V γ 9V δ 2 T 細胞による IFN- γ , granzyme B などのエフェクター分子の産生を亢進させ、リンパ球の活性化マーカーである ICAM-1 や CD25 の細胞表面での発現を促進した。また、co-inhibitory receptor である BTLA の発現量を減少させた。さらに、IL-12 と IL-18 による共刺激は V γ 9V δ 2 T 細胞に抗原非依存的な細胞増殖を誘導した。また IL-12/IL-18 により活性化された V γ 9V δ 2 T 細胞は、RPMI8226 や MG-63 などの腫瘍細胞を効率的に殺傷した。以上の結果から、V γ 9V δ 2 T 細胞は IL-12 と IL-18 の共刺激により抗原刺激非存在下で活性化されることが明らかとなった。次に IL-12/IL-18 による V γ 9V δ 2 T 細胞の活性化のメカニズムを検討した。転写調節因子である T-bet, Eomes, I κ B ζ の発現量を解析したところ、IL-12/IL-18 刺激による T-bet と Eomes の発現量の変化はわずかであったが、I κ B ζ はその発現が強力に誘導された。I κ B ζ の V γ 9V δ 2 T 細胞活性化における役割を明らかにするために、siRNA による遺伝子ノックダウンを行った。IL-12/IL-18 刺激で誘導される IFN- γ の発現は I κ B ζ のノックダウンにより抑制された。次に、IL-12/IL-18 刺激による IL-12 受容体の発現量の変化を検討したところ、共刺激により IL-12R β 2 の細胞表面での発現量が上昇した。この変化はさらに JAK2/TYK2 によるシグナル伝達を亢進し、STAT4 の活性化時間を延長させた。以上の結果から、IL-12 と IL-18 による V γ 9V δ 2 T 細胞の活性化は、I κ B ζ の発現誘導、IL-12R β 2 の発現亢進とその結果として持続的な STAT4 の活性化を介して誘導されることが明らかとなった。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

IL-12/IL-18 mediated activation of human V γ 9V δ 2 T cells

○Domae E¹, Goda S², Yoshikawa Y¹, Kamada A¹, Ikeo T¹

¹Dept Biochem, Osaka Dent Univ

²Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

V γ 9V δ 2 T cells, the major subset of the human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells, respond to microbial infection and stressed cells through the recognition of phosphoantigens. In contrast to the growing knowledge of antigen-mediated activation mechanisms, the antigen-independent, cytokine-mediated activation mechanisms of V γ 9V δ 2 T cells are poorly understood. In this study, we show that IL-12 and IL-18 synergize to activate ex vivo-expanded V γ 9V δ 2 T cells. The treatment of V γ 9V δ 2 T cells with IL-12 and IL-18 enhanced effector functions, including the expression of IFN- γ and granzyme B, and cytotoxicity. These enhanced effector responses following IL-12 and IL-18 treatment were associated with homotypic aggregation, enhanced expression of ICAM-1, induction of I κ B ζ expression, sustained activation of STAT4 and decreased expression of the B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA) coinhibitory receptor. IL-12 and IL-18 also induced the antigen-independent proliferation of V γ 9V δ 2 T cells. The enhanced production of IFN- γ and cytotoxic activity are critical for cancer immunotherapy using V γ 9V δ 2 T cells, and the down-regulation of BTLA renders these cells unresponsive to the inhibitory effect of herpes virus entry mediator. Thus, the combined treatment of ex vivo-expanded V γ 9V δ 2 T cells with IL-12 and IL-18 may serve as a new strategy for the therapeutic activation of these cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C7 *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS による Th17 細胞への分化誘導におけるカテプシン S の役割

○出来田雅人^{1,2}, 武 洲², 中西 博², 高橋 一郎¹

¹九大 院歯 矯正

²九大 院歯 口腔機能分子

【目的】 歯周病菌の *Porphyromonas gingivalis* (Pg) が糖尿病や動脈硬化など全身疾患の誘発や進展に関与することが報告されている。最近、私たちは二次リンパ組織である脾臓内の樹状細胞が産生するカテプシン S (CatS) 依存的に分化した Th1 細胞が神経障害性疼痛の慢性化において重要な役割を果たすことを報告した (J Neurosci, 2014)。そこで今回は、pgLPS 全身投与に伴う脾臓内の CD4 陽性細胞の分化ならびに CatS の役割について検討を行った。【方法】 PgLPS を 7 日間連続全身投与 (5 mg/kg/day, i.p.) を行い脾臓の解析を行った。【結果と考察】 野生型 DBA マウス (♀, 12 週齢) では脾臓肥大、樹状細胞 (CD11c 陽性) における CatS 発現増加ならびに Th17 細胞への分化が認められた。一方、CatS 欠損マウスにおいてはこのような変化は認められなかった。さらに、PgLPS は野生型マウスの脾臓より単離した樹状細胞において IL-6 ならびに IL-23 産生を誘導したが、CatS の特異的阻害剤 (Z-Phe-Leu-COCHO) 存在下では検出できなかった。また、CatS 欠損マウスの脾臓より単離した樹状細胞においても IL-6 ならびに IL-23 産生は認められなかった。以上の結果より、PgLPS の全身投与に伴い樹状細胞において増大した CatS は IL-6 ならびに IL-23 の産生を誘導することで、CD4 陽性 T の Th17 細胞への分化を誘導している可能性が示唆された。今後、CatS による IL-6 ならびに IL-23 の産生誘導メカニズムについて解明する予定である。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The role of cathepsin S in Th17 cell differentiation by *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide

○Dekita M^{1,2}, Wu Z², Nakanishi H², Takahashi I¹

¹Sect Orthod Dentofac Orthop, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Aging Sci Pharmacol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

It is widely accepted that periodontal bacteria of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) is involved in the induction and progression of systemic diseases such as diabetes and arteriosclerosis. Recently, we reported that the role of Cathepsin S in Th1 Cell-Dependent Transition of Nerve Injury-Induced Acute Pain to a Chronic Pain State (J Neurosci, 2014). So, we have studied the role of CatS in the differentiation of CD4-positive cells in the spleen due to pgLPS systemic administration. After PgLPS systemic administration for 7 days (5 mg/kg/day, ip), the wild-type DBA mice (female, 12 weeks old) spleen hypertrophy, CatS increased expression in dendritic cells (CD11c positive) and observed Th17 differentiation of the T cells. However, it was not observed such changes in the CatS $-/-$ mice. Furthermore, PgLPS induced IL-6 and IL-23 production in isolated dendritic cells from the spleens of wild-type mice. But it could not be detected in the presence specific inhibitor of CatS. (Z-Phe-Leu-COCHO) and CatS $-/-$. Thus, CatS which is increased in dendritic cells with the systemic administration of PgLPS inducing the production of IL-6 and IL-23, so it is suggested the possibility that CatS induce differentiation into Th17 cells of the CD4-positive T cell.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C8 LPS 誘導 M1 マクロファージ分化におけるビスフォスフォネートの影響

○金子 純也^{1,2}, 引地 尚子³, 沖永 敏則¹, 有吉 渉¹, 西原 達次¹

¹九歯大 感染分子生物

²九歯大 顎顔面外科

³九歯大 口腔保健

【背景と目的】ビスフォスフォネートは、骨粗鬆症や悪性腫瘍の骨転移などの治療に広く用いられている。その一方で、ビスフォスフォネート関連顎骨壊死の発症が問題となっており、そのメカニズムは解明されていない点が多い。マクロファージは、M1/M2型に分類され、炎症の誘導や増悪にM1マクロファージが関与することが報告されている。そこで、今回、*in vitro*におけるM1マクロファージ分化モデルを使用し、マクロファージ分化におけるビスフォスフォネートの影響について解析を行った。**【材料と方法】**phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 処理により、ヒト単球様 THP-1 細胞をマクロファージ様細胞へ分化させた。大腸菌由来 lipopolysaccharide (LPS) を用いて M1 マクロファージ分化を誘導した。ビスフォスフォネートの一種であるゾレドロネートで刺激した細胞の遺伝子発現を real-time RT-PCR で解析した。あわせて CD 抗原発現を Flow cytometry で解析した。**【結果】**LPS で刺激した THP-1 細胞は、M1 マクロファージの分化マーカーである CD80, IL-1B, IL-6 の遺伝子を強く発現していた。興味深いことに、LPS とゾレドロネートを併用すると CD80, IL-1B, IL-6 の発現は更に上昇した。Flow cytometry による分析の結果、LPS で刺激した THP-1 細胞では、CD80 の発現の著しい上昇が認められた。LPS とゾレドロネートを併用すると CD80 の発現は更に上昇した。**【考察】**LPS 存在下において、ゾレドロネートは M1 マクロファージ分化を増強することが明らかとなり、ゾレドロネートにより炎症反応が増強される可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of bisphosphonate on M1-polarized THP-1 cells induced by lipopolysaccharides

○Kaneko J^{1,2}, Hikiji H³, Okinaga T¹, Ariyoshi W¹, Nishihara T¹

¹Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ

²Div Oral Maxillofac Surg, Kyushu Dent Univ

³Sch Oral Health Sci, Kyushu Dent Univ

Objective: Bisphosphonates are frequently used in the treatment of osteoporosis and bone metastasis in malignant tumors. However, the onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) in the dental treatments has become the serious issues nowadays. Macrophages are divided into M1/M2 macrophages. It is well known that M1 macrophages are involved in the induction and exacerbation of inflammation. The purpose of this study is to investigate the effects of Zoledronate (Zol), one of bisphosphonates, on M1-polarized THP-1 cells induced by lipopolysaccharides (LPS). **Material and Methods:** Human monocyte-like THP-1 cells were polarized to macrophage-like cells by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), and then polarized to M1 macrophages by LPS. The gene expression was examined by real-time RT-PCR. The expression of CD antigens was examined by flow cytometry. **Results:** The mRNA expressions of CD80, IL-1B and IL-6 were increased in LPS-treated THP-1 cells, and Zol enhanced the expression of these molecules. Furthermore, we confirmed that Zol enhanced the expression of CD80 antigen in these cells using flow cytometry. **Discussion:** These results indicate that Zol upregulates the expressions of M1 markers in LPS-treated THP-1 cells, suggesting that Zol is an accelerator of the M1-macrophage polarization.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

01-C9 *Streptococcus sanguinis* の IL-1 α 産生誘導活性におけるインフラマソームの関与

○佐伯 歩¹, 長谷部 晃¹, 亀崎 良助¹, 鈴木 敏彦², 柴田健一郎¹

¹北大 院歯 口腔分子微生物

²医科歯科大 院医歯 細菌感染

Streptococcus sanguinis (Ss) は、感染性心内膜炎の代表的起因菌として注目されており、その病態の形成に IL-1 が関与していることが報告されている。IL-1 は IL-1 α ならびに IL-1 β からなり、これまで、我々は Ss がマウス樹状細胞ならびにマクロファージにおいて NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 β の産生を誘導することを報告した。そこで、本研究では、Ss の IL-1 α 産生誘導活性について検証した。菌株は *S. sanguinis* ATCC 10556 を用いた。標的細胞として A/J マウス由来樹状細胞 (XS-106 細胞)、さらに、C57BL/6 (B6) マウスならびに caspase-1, ASC あるいは NLRP3 をノックアウトしたマウスより採取した骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ (BMM) を用いた。IL-1 α の産生は ELISA 法ならびに Western blot 法で測定した。Ss は XS-106 細胞ならびに B6 由来の BMM に IL-1 α の産生を誘導し、caspase-1, NLRP3 ならびに ASC をノックアウトすることにより有意に減弱した。また、本活性は calpain 阻害剤である MDL 28170 により阻害されたが、caspase-1 阻害剤である z-YVAD-FMK では阻害されなかった。さらに、Proximity ligation assay により IL-1 α と caspase-1 が細胞質で共局在することが観察された。これらの結果から、Ss は BMM に対して IL-1 α 産生を誘導する活性を有し、その活性発現には NLRP3 インフラマソームが関与していることが示唆された。しかしながら、NLRP3 インフラマソームの活性化で誘導される caspase-1 のタンパク質分解活性が重要ではなく、caspase-1 と IL-1 α が細胞質で共局在していることが何か重要な役割を果たしているのではないかと推測された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Involvement of inflammasome in IL-1 α -inducing activity of *Streptococcus sanguinis*

○Saeki A¹, Hasebe A¹, Kamezaki R¹, Suzuki T², Shibata K¹

¹Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

²Div Bacter Pathogenesis, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Streptococcus sanguinis (Ss), a human oral inhabitant, is one of the most potent agents of infective endocarditis (IE). Recently, the proinflammatory cytokine IL-1 consisting of IL-1 α and IL-1 β has been shown to contribute to the onset of IE. Recently, we showed that Ss activates the NLRP3 inflammasome to produce IL-1 β in murine dendritic cells and macrophages. Therefore, this study was designed to examine whether Ss has the activity to induce IL-1 α production by these cells. The murine dendritic cell line XS106 and bone marrow-derived macrophages (BMMs) from C57BL/6 (B6), NLRP3-, ASC- and caspase-1-deficient mice were used. IL-1 α secreted was measured by ELISA and Western blotting. Ss had the activity to induce secretion of IL-1 α by XS106 and BMMs from B6 in a dose-dependent manner, but the activity toward NLRP3-, ASC- and caspase-1-deficient BMMs were significantly attenuated. The calpain-1 inhibitor MDL28170 but not the caspase 1 inhibitor z-YVAD-fmk attenuated the IL-1 α -inducing activity. Colocalization of caspase-1 with IL-1 α was detected by Proximity ligation assay. Thus, this study suggests that the NLRP3 inflammasome is involved in the IL-1 α -inducing activity of Ss, which might be mediated by the colocalization of caspase-1 and IL-1 α in cytosol but not by the proteolytic activity of caspase-1.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C10 歯周病関連細菌 *Treponema denticola* の株間性状比較解析

○永野 恵司, 長谷川義明, 吉田 康夫, 吉村 文信

愛院大 歯 微生物

【目的】4株の *T. denticola* [ATCC 由来 35404 (#04), 35405 (#05), 33520 (#20), 33521 (#21)] の種々の性状, 特に運動性について比較解析を行った。【結果】対数増殖期までは菌株間に差異はみられなかったが, 定常期で, #05 および #20 の濁度が, #04 および #21 より高値に達した。位相差顕微鏡観察で回転運動性を検討したところ, #04 が最も活発で, 次に #21 であった。#05 および #20 は, ほとんど運動していなかった。軟寒天培地での拡散性は, 回転運動性とほぼ一致し, #04 と #21 は大きな白濁環を形成したが, #20 および #05 は小さかった。透過型電子顕微鏡観察では, #05 および #20 のべん毛は長く伸び, 菌体端から突出したものが高頻度に見られた。べん毛繊維構成タンパク質 (FlaB1, FlaB2 および FlaB3) の発現を, ウェスタンブロットおよび定量的逆転写 PCR 法で評価した。FlaB1 発現は, 菌株間に差異はみられなかった。FlaB2 発現は, #04 で低下が見られた。FlaB3 発現は, #05 および #20 で顕著に高く, 次に #21 で, #04 の発現はきわめて低かった。また, #05 および #20 で, FlaB3 の翻訳後修飾に異常がある可能性が示された。キモトリプシン様プロテアーゼ活性, および歯肉上皮細胞 (Ca9-22) への付着性が, #04 および #21 に比して, #05 および #20 は, 顕著に高かった。【結論】高運動性 (#04, #21) および低運動性 (#05, #20) 株が存在した。低運動性の理由の一つとして, FlaB2 および FlaB3 の発現量および翻訳後修飾の異常により, べん毛が異常伸長したためであることが示唆される。また, 今回検討した種々の性状が, 運動性と相関する傾向がみられた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Comparative analysis of periodontal-pathogen *Treponema denticola* strains

○Nagano K, Hasegawa Y, Yoshida Y, Yoshimura F

Div Microbiol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent

We comparatively examined 4 strains of *T. denticola* [ATCC-35404 (#04), -35405 (#05), -33520 (#20), -33521 (#21)] in several properties, especially in motility. Phase-contrast microscopy found the differential motility between the strains; #04 showed the highest motility, and #21 showed the next highest, while the others (#05 and ATCC #20) little showed motility. Transmission electron microscopy showed that the low motility strains exhibited extracellular flagellar protrusion because of flagellar elongation. The bacterial flagellar filament is composed of 3 flagellins of FlaB1, FlaB2 and FlaB3. FlaB1 expression was comparable between the strains. In FlaB2, ATCC 35404 showed the lowest expression. FlaB3 expression was #05, #20, #21, and #04 in descending order. Additionally, the low motility strains showed faster electrophoretic mobility of FlaB3, suggesting that the low motility strains were defective in posttranslational modification of the protein. These results suggest that inappropriate expressions of FlaB2 and/or FlaB3 is attributed to the unusual elongation of flagella, and eventually to a decrease in motility. Furthermore, the low motility strains showed higher activities in growth, chymotrypsin-like protease, and adherence to gingival epithelial cells. These results suggest that there is a relationship between motility and these properties.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C11 *Prevotella intermedia* strain 17 と 17-2 間でのゲノム比較によるバイオフィルム関連遺伝子の検討

○山中 武志, 南部 隆之, 円山 由郷, 王 宝禮, 真下 千穂, 山根 一芳
大歯大 細菌

Prevotella intermedia は口腔常在の黒色色素産生偏性嫌気性グラム陰性桿菌で、歯周疾患のみならず身体他部の膿瘍形成の原因菌としても注目されている。臨床分離の *P. intermedia* の多くは菌体外多糖を産生し、強固なバイオフィルムを形成するが、その形成機構の全容解明には至っていない。【目的】*P. intermedia* のバイオフィルム形成機構解明の一助とするため、バイオフィルムを形成する strain 17 と、strain 17 から得られたバイオフィルムを形成しないバリエーション (strain 17-2) との間でゲノム比較を行い、バイオフィルム形成関連遺伝子の追及を試みた。【方法】すでに決定されている両菌株のゲノム配列 (strain 17 chromosome I: NC_017860; chromosome II: NC_017861; strain 17-2 chromosome I: AP014926; chromosome II: AP014925) を、配列比較用ソフトウェア MUMmer により解析した。【結果】比較解析の結果、strain 17-2 において 1 塩基の変異が 213 箇所、chromosome II 上の 3185 bp の欠失が明らかとなった。欠失箇所の遺伝子配列を検討したところ、sugar transferase (locus tag: PIN17_RS10270), capsule biosynthesis protein (RS10275), chain-length determining protein (RS10280), polysaccharide biosynthesis protein (RS10285) とアノテーションされた 4 遺伝子が欠失の影響を受けていることが明らかとなった。【考察】これら遺伝子を含む遺伝子クラスターが *P. intermedia* の菌体外多糖合成に直接関わっているかどうかは、今後さらに詳細に検討する必要があるが、strain 17-2 がバイオフィルム形成性を完全に失っていることから考えて、これらの遺伝子が糖鎖合成に関与していることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Exploration of genes putatively involved in biofilm formation of *Prevotella intermedia* by a genome comparison between strains 17 and 17-2

○Yamanaka T, Nambu T, Maruyama Y, Wang P, Mashimo C, Yamane K

Dept Bacteriol, Osaka Dent Univ

Prevotella intermedia (*P. intermedia*), a gram-negative anaerobic rod, has been implicated in the development of chronic oral infection. We previously reported that the capacity to form biofilm in *P. intermedia* might contribute to their resistance against host innate immune responses, however, gene expression events behind the exopolysaccharide production in *P. intermedia* biofilm still remain to be elucidated. To explore genes involved in *P. intermedia* biofilm, we performed a genome comparison between biofilm-forming *P. intermedia* strain 17 and strain 17-2, a variant of strain 17 which lacked the biofilm-forming capacity. Genome sequences of both strains in NCBI database (strain 17 chromosome I: NC_017860; chromosome II: NC_017861; strain 17-2 chromosome I: AP014926; chromosome II: AP014926) were used in this study. A genome comparison between strains 17 and 17-2 was undertaken with MUMmer. The comparative analysis showed 213 single nucleotide variants on the whole genome sequence and a deletion of 3185 bp on the chromosome II of strain 17-2. The latter larger deletion affected four genes annotated as sugar transferase, capsule biosynthesis protein, chain-length determining protein and polysaccharide biosynthesis protein, respectively. These results suggest that the gene cluster highlighted in this study might be involved in the biofilm formation of this organism.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C12 インプラント周囲炎と歯周炎における細菌叢メタトランスクリプトーム解析

○渡辺 孝康¹, 芝 多佳彦², 加地 博一³, 竹内 康雄², 丸山 史人⁴, 和泉 雄一²,
中川 一路⁴

¹東大 院農生命 食の安全セ 食品病原微生物

²医科歯科大 院医歯 歯周病

³医科歯科大 院医歯 顎顔面外科

⁴京大 院医 微生物感染症

インプラント周囲炎は歯周炎に類似した病態を呈する疾患で、歯周炎の発症・進行に重要な細菌種がインプラント周囲炎でも関わるとの報告もあるが、細菌学的側面を含めたその発症機序は不明である。今回、インプラント周囲炎と歯周炎の病変を同一口腔内に有する国内患者 12 名から、両病変に局在する細菌叢試料を採取し、全 RNA の塩基配列情報を高速シーケンサーにて取得した。データ中の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を調べたところ、細菌叢を構成する細菌種組成に 2 疾患間で差異がみられ、同遺伝子のみを標的とする解析を実施した過去の報告と整合するものであった。その一方で、mRNA の塩基配列から構成した遺伝子発現プロファイルは 2 疾患間で類似傾向にあった。ここで mRNA の由来細菌種を調べると、その組成には疾患間の差異が認められ、2 つの細菌種の量的関係が正の相関を示した共起細菌種のネットワークが疾患毎に特異な形で構成された。以上より、インプラント周囲炎と歯周炎の細菌叢では、主要な遺伝子発現を担う細菌種が異なっており、そのような遺伝子発現プロファイルの相違が 2 疾患の病態や治療感受性の相違に関わる可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Metatranscriptomic analyses of microbiota in peri-implantitis and periodontitis lesions

○Watanabe T¹, Shiba T², Kachi H³, Takeuchi Y², Maruyama F⁴, Izumi Y², Nakagawa I⁴

¹Lab Food-borne Pathog Microbiol, Res Center for Food Safety, Grad Sch Agri & Life Sci, The Univ of Tokyo

²Sect Periodontol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

³Sect Maxillofac Surg, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

⁴Dept Microbiol, Kyoto Univ Grad Sch Med

Peri-implantitis is a periodontitis-like disease in human oral cavity, and little is known in its etiology although association of microbial species responsible for onset and progression of periodontitis is suggested. In this study we obtained nucleotide sequences of total RNA in microbiota samples that were collected from peri-implantitis and periodontitis sites of 12 Japanese patients harboring both lesions. The microbial composition was dissimilar between the two diseases in 16S rRNA-based profiles, which was consistent with previous studies exclusively focused on 16S rRNA. On the other hand, mRNA-based gene expression profiles exhibited similarity between the diseases. The source species of detected mRNA were dissimilar between the diseases, and different form of microbial networks was constructed by co-occurring species that showed positive correlation in their mRNA abundance. It was demonstrated that there was difference of microbial species responsible for the main part of gene expression between peri-implantitis and periodontitis lesions, suggesting association of such difference of gene expression profile with dissimilarity of symptoms or treatment susceptibility between the diseases.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C13 唾液マイクロバイームは歯周病の重症度を反映する

○影山 伸哉, 竹下 徹, 朝川美加李, 柴田 幸江, 山下 喜久

九大 院歯 口腔予防

【目的】唾液は舌苔やプラークと常に接しており、唾液にはそれらの部位から剥離した様々な細菌が含まれていると考えられる。しかし、これまでの多くの研究では唾液中の細菌構成は舌苔と非常に類似すると報告されており、プラーク由来の細菌についてはあまり注目されてこなかった。縁下プラークの細菌群集が歯周病と関連することはすでに知られており、唾液に含まれる縁下プラーク由来の細菌を調べることは、唾液を用いた歯周病の評価につながると考えられる。本研究では口腔の各部位の細菌構成を比較し、縁下プラークが唾液マイクロバイームに及ぼす影響について検討した。【方法】歯科医院を訪れた14名の歯周病患者から採取した、唾液、舌苔、縁上プラーク、縁下プラークよりDNAを抽出し、16S rRNA領域の遺伝子を増幅した。増幅断片の塩基配列は次世代シーケンサー Ion PGM を用いて解読し、それぞれの検体の細菌構成を明らかにした。【結果】各部位の類似度をUniFrac 距離を用いて評価すると、唾液は舌苔と類似しており、縁下プラークとは大きく異なっていた。各検体をOTU (細菌種) レベルで解析すると、いずれかの部位で平均構成比率が1%以上を占める主要な56 OTUのうち、階層的クラスタリング解析によって、red complex を含む13 OTUが縁下プラークに特徴的な「縁下細菌群」として選出された。縁下細菌群が縁下プラークにおいて占める割合は4 mm以上のポケットの割合と有意に相関していた ($r=0.70$)。縁下細菌群は縁下プラーク中だけでなく唾液中にも存在しており、唾液中の縁下細菌群の構成比率は縁下プラーク中の構成比率と有意な相関を示し ($r=0.58$)、さらに4 mm以上のポケットの割合とも有意に相関していた ($r=0.77$)。【結論】唾液マイクロバイームは全体的には舌苔と類似していたが、一部に縁下プラーク由来の細菌を含んでおり、それによって歯周病の重症度の評価が可能であることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Salivary microbiome reflects the severity of periodontitis

○Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Yamashita Y

Sect Prevent Dent Public Health, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Introduction: Saliva constantly contacts with tongue coating and plaque, and contains various bacteria in these sites. However, little attention has given to bacteria derived from subgingival plaque in saliva. In this study, we compared the bacterial composition in each oral site, and considered the effect of subgingival plaque on salivary microbiome. **Methods:** Saliva, tongue coating, supra- and subgingival plaque were collected from 14 patients with periodontitis, and their bacterial composition were investigated using 16S rRNA gene amplicon sequencing. **Results:** An analysis of similarity using UniFrac revealed that the salivary overall bacterial community was similar to tongue coating, and quite different from subgingival plaque. Of main 56 OTUs (species-level operational taxonomic units), 13 OTUs including red complex were selected as subgingival species. The relative abundance of subgingival species in subgingival plaque was significantly correlated with the ratio of pocket with ≥ 4 mm Dept h ($r=0.70$). The relative abundance of subgingival species in saliva was significantly correlated with that in subgingival plaque ($r=0.58$), and also significantly correlated with the ratio of pocket with ≥ 4 mm Dept h ($r=0.77$). **Conclusion:** The salivary microbiome is similar to tongue coating, but contains subgingival-derived bacteria and reflects the severity of periodontitis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C14 柿タンニンがポリマイクロバイアルバイオフィルムの Regrowth に与える影響

○富山 潔¹, 石澤 将人¹, 渡辺 清子², 河田 亮³, 齋藤 正寛⁴, 高橋 理³,
浜田 信城², Exterkate R.A.M⁵, 向井 義晴¹

¹神歯大 院歯 う蝕制御修復

²神歯大 院歯 微生物感染

³神歯大 院歯 神経組織発生

⁴東北大 院歯 保存

⁵ACTA Preventive Dent The Netherlands

【目的】 渋柿由来の縮合型タンニン含有製剤である Pancil PS-M のポリマイクロバイアルバイオフィルム regrowth への影響を検討した。【方法】 バイオフィルムの形成にはガラス円板ならびに Exterkate らの考案した High-throughput active attachment model を用いた。実験群は、(1) 非処理群 (Cont), (2) 4.0 vol% Pancil PS-M 群 (P), (3) 0.2% グルコン酸クロルヘキシジン群 (C) (4) 緑茶抽出液群 (G) の 4 群とした。培養には刺激唾液含有 McBain 2005 を用い、培養液の交換時に pH を測定した。培養 24 時間の時点で各処理剤に 5 分浸漬後、72 時間まで嫌気培養し、生菌数を算定する群と DNA 抽出後、形成されたバイオフィルム中の Streptococcus 属, Actinomyces 属, Veillonella 属の遺伝子コピー数をリアルタイム定量 PCR 法により推定する群とに分けて実験に供した。【結果および考察】 P 群の生菌数は、培養停止の時点で、Cont, C および G 群に比較し有意に低かった。リアルタイム定量 PCR 法による分析結果では、バイオフィルム中で Veillonella 属の生菌数が P および G 群において Cont に比較して持続的に抑制され、Streptococcus 属は、P 群で最も抑制されていた。pH drop は P 群で最も抑制されていた。渋柿由来の縮合型タンニンと緑茶タンニンは、バイオフィルム中の Veillonella 属を顕著に抑制することを示し、これは両群のタンニンの効果であると考えられた。渋柿由来タンニンは、Streptococcus 属および Veillonella 属を顕著に抑制し、pH drop も抑制したことから、高病原性を防ぐのみならず、バイオフィルム形成を持続的に抑制する可能性が示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effects of persimmon tannin on regrowth of polymicrobial biofilms

○Tomiyama K¹, Ishizawa M¹, Watanabe K², Kawata A³, Saito M⁴, Takahashi O³, Hamada N²,
Exterkate R⁵, Mukai Y¹

¹Dept Cariol Restorative Dent, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

²Dept Microbiol, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

³Dept Neuroanat, Histol Embryol, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

⁴Div Oper Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

⁵Dept Preventive Dent, Academic Centre for Dent Amsterdam (ACTA), The Netherlands

Purpose: This study investigated effects of persimmon tannin on regrowth of biofilms. **Materials & Methods:** Polymicrobial biofilm were cultured on glass coverslips using dilution of stimulated saliva of one healthy adult in a high-throughput active attachment model. Experiments were performed anaerobically in McBain medium, which was refreshed twice daily on a schedule of 10 h and 14 h. After biofilm formation for 24 h, single treatment was conducted as follows: Specimens were immersed for 5 min in: 0.2% chlorhexidine digluconate (C); Persimmon tannin (P); Green tea extract (G); and deionized water (cont). After treatments, biofilm growth was continued for 48 h, and then biofilms were harvested and plated on blood agar plates. pH measurement of spent mediums were performed. Effects of treatments on gene copy number of Streptococci, Actinomyces and Veillonella was evaluated by real time PCR. **Results:** C, G and P groups showed significantly lower CFU than cont. Also, P group remarkably suppressed regrowth of alive bacteria in biofilms comparing C and G groups. pH drop was also suppressed significantly after treatment with P comparing other groups. P group did not show gene copy of Veillonella. **Conclusion:** Persimmon tannin has a potential to suppress the regrowth of polymicrobial biofilms. **Conflict of Interest:** The authors declare no competing interests.

O1-C15 分子シャペロン DnaK をターゲットにした低分子化合物を用いた新しいバイオフィーム阻害法の開発

○有田(森岡) 健一¹, 永尾 潤一², 成田 由香², 橋本麻利江², 田崎 園子², 池崎晶二郎², 長 環², 田中 芳彦²

¹福歯大 先端科学セ

²福歯大 感染生物

バイオフィームは固体表面に形成される微生物のコミュニティであり、バイオフィーム内部の細胞が抗生物質や宿主免疫機構に耐性を示すことで慢性感染症の原因となることが問題となっている。我々は、大腸菌一遺伝子欠損株ライブラリー (KEIO コレクション) を用いた網羅的な解析から、タンパク質の品質管理を担う分子シャペロン DnaK がバイオフィーム形成に重要な役割を果たすことを見出した。本研究では、大腸菌 K-12 株をモデルとして、DnaK の機能を阻害する化合物によってバイオフィーム形成を抑制できるかを検証した。その結果、天然フラボノール一種である Myricetin が増殖は阻害せず、濃度依存的にバイオフィーム形成を阻害すること (IC₅₀ = 46.2 μM) を発見した。透過型電子顕微鏡により細胞外構造体の産生を観察したところ、Myricetin を添加した場合には *dnaK* 欠損株と同様に、バイオフィーム形成に重要な細胞外アミロイド線維 “curli” の産生が抑制されていることが分かった。また、Myricetin 添加時には、*dnaK* 欠損株と同様の複数の表現型が観察されたことから、Myricetin は DnaK の機能を阻害することで curli に依存したバイオフィームの形成を抑制することが示唆された。また、メチシリン耐性臨床分離株を含む黄色ブドウ球菌に対しても、Myricetin が最少生育阻止濃度以下の濃度でバイオフィーム形成を阻害することを見出した。以上より、Myricetin はグラム陰性菌だけでなく、グラム陽性菌のバイオフィームに対しても有効であり、DnaK が抗バイオフィーム薬の標的となりうることが示された。現在、Myricetin 及びその類縁体を用いてミュータンス菌のバイオフィーム形成にも阻害能があるか検証中である。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Novel strategy for biofilm inhibition using small molecules targeting molecular chaperone DnaK

○Arita-Morioka K¹, Nagao J², Narita Y², Hashimoto M², Tasaki S², Ikezaki S², Cho T², Tanaka Y²

¹Adv Sci Res Cent, Fukuoka Dent Coll

²Div Infect Biol, Fukuoka Dent Coll

Biofilms are complex communities of microorganisms that attach to surfaces. Since cells embedded in biofilms acquire increased tolerance against antimicrobial agents and host immune systems, biofilm-associated infectious diseases tend to become chronic. Recently, our comprehensive analyses using single-gene deletion mutants for *E. coli* K-12 genes revealed that molecular chaperone DnaK is important for biofilm formation. In this study, we examined whether small molecules targeting DnaK could prevent the biofilm formation. A widely distributed flavonol Myricetin inhibited biofilm formation at concentrations (IC₅₀ = 46.2 μM), but did not significantly affect the bacterial growth. Transmission electron microscopic observation demonstrated that Myricetin inhibits production of extracellular amyloid fibrils. Some phenotypic analyses showed that Myricetin alters the phenotypes of *E. coli* wild type cells resembling the consequence of the *dnaK* deletion mutant. These data strongly suggest that Myricetin inhibits cellular functions of DnaK in vivo, leading to defects in curli biogenesis and biofilm formation. Interestingly, Myricetin also suppressed biofilm formation of *Staphylococcus aureus* including clinically isolated methicillin-resistant strains at concentrations where their growth was not inhibited. These results altogether provide a more accurate insight into the significance of DnaK in the curli-dependent biofilm formation and also suggest that DnaK is a potential target for anti-biofilm drugs.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C16 NF- κ B 非古典的経路は内軟骨性骨形成を調節している

○中富 千尋¹, 古株彰一郎¹, 松原 琢磨¹, 中富 満城², 浦田真梨子¹, 自見英治郎¹

¹九歯大 分子情報生化学

²九歯大 解剖

【目的】内軟骨性骨形成では多くの転写因子が関与し、その複雑な形成過程を厳密に制御している。本研究では、NF- κ B 非古典的経路が恒常的に活性化している NF- κ B2p100 変異型マウス (Δ p100 マウス)が低身長症を呈する事に着目し、NF- κ B 非古典的経路の新たな生理機能として内軟骨性骨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】野生型および Δ p100 マウスの脛骨を採取し、脛骨成長板軟骨の形態及び各種軟骨細胞分化マーカーの発現パターンを解析した。さらに野生型および Δ p100 新生仔マウス肋軟骨より得られた初代培養軟骨細胞をペレットカルチャー系により3次元的に培養し、組織学的手法およびリアルタイム PCR 法を用いて分化マーカーの発現を解析した。

【結果と考察】 Δ p100 マウスの成長板軟骨においては、軟骨細胞のカラム構造の乱れおよび肥大軟骨細胞層の狭小化が認められ、肥大軟骨細胞マーカーである Collagen type X の陽性領域の減少が認められた。TRAP 染色の結果、成長板軟骨直下の破骨細胞数は野生型および変異型で著明な変化は認められないことから、破骨細胞による肥大軟骨細胞層破壊の可能性は低いことが明らかになった。また、TUNEL 染色および Ki-67 の免疫染色の結果から、 Δ p100 マウスの軟骨細胞ではアポトーシス活性および細胞増殖に異常は認められなかった。以上の結果より、 Δ p100 マウスの成長板軟骨の異常は軟骨細胞の分化異常に起因する可能性が高いと考えられた。そこで、ペレットカルチャー系を用いて初代培養軟骨細胞の分化誘導実験を行ったところ、 Δ p100 マウス由来軟骨細胞において Collagen type X のタンパク発現および mRNA 発現低下が認められた。以上より、NF- κ B 非古典的経路は成長板軟骨における軟骨細胞の肥大化を制御し、生後の骨伸長の調節に関与している可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

NF- κ B regulates the endochondral bone formation

○Nakatomi C¹, Kokabu S¹, Matsubara T¹, Nakatomi M², Urata M¹, Jimi E¹

¹Div Mol Signal Biochem, Kyushu Dent Univ

²Div Anat, Kyushu Dent Univ

The endochondral ossification is regulated spatiotemporally by many transcription factors and the defect of these factors leads the bone malformation such as dwarfism. Mice lacking the C-terminal region of NF- κ B2 p100 (δ p100 mice), in which NF- κ B alternative pathway is constitutively activated, exhibit retarded growth and shortened long bones, suggesting that NF- κ B alternative pathway is involved in endochondral bone formation. We observed that narrower hypertrophic zone in the growth plate of δ p100 mice and the expression of type-X collagen (Col X), a differentiation marker of hypertrophic chondrocytes, was markedly reduced. In addition, there is no difference in the apoptosis and the cell proliferation between wild-type and δ p100 mice. To further examine how NF- κ B alternative pathway regulates chondrocyte differentiation, we examined the differentiation process of chondrocytes in vitro using pellet cultures of primary chondrocytes prepared from wild-type and δ p100 mice. As a result, the expression of Col X decreased in the pellets derived from δ p100 mice. These data suggest that NF- κ B alternative pathway is involved in the regulation of hypertrophy of chondrocytes during postnatal growth and controls the elongation of long bones.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C17 マウス頭蓋底軟骨結合で発現する Dgcr2 遺伝子は肥大軟骨細胞の TGF- β シグナルを制御する

○梶原 景正

東海大 医 基礎医学

我々は、22q11.2欠失症候群のゲノム欠失領域にコードされる DGCR2 遺伝子のマウスホモログ Dgcr2 の遺伝子機能について、内在性 Dgcr2 プロモーターで発現される GFP をノックインした Dgcr2 ノックアウト (Dgcr2-KO) マウスを用いて検討している。Dgcr2-KO マウスは、発生段階では特に異常はみられなかったが、生後離乳時期より骨格形成に軽度の異常がみられ、このときノックイン GFP は軟骨内骨化の軟骨細胞層に強く発現していた。Dgcr2-KO マウスの顎顔面領域の組織化学的解析では、頭蓋底軟骨結合において静止軟骨細胞や肥大軟骨細胞に GFP 発現が認められ、これら軟骨細胞の数が低下していた。我々は Dgcr2 遺伝子産物が何らかのシグナル伝達を制御し、その欠失が 22q11.2 欠失症候群の骨格異常に起因した病態形成に関与している可能性を考えた。そこで Dgcr2-KO マウスより初代軟骨細胞を調製し、Dgcr2 が軟骨細胞にどのような影響を与えているのかを検討した。通常の培養条件では異常はみられなかった Dgcr2-KO 軟骨細胞であるが、培地中に TGF- β を投与すると、形態変化とともに細胞増殖が亢進した。このとき II 型コラーゲンを発現する Dgcr2-KO 初代軟骨細胞は減少し、I 型コラーゲンを発現する線維芽細胞様形態を示す細胞が増加した。この変化は TGF- β シグナル阻害剤により解消した。以上の結果から、Dgcr2 遺伝子産物は、TGF- β 受容体と相互作用することで、TGF- β シグナルを制御して分化過程にある軟骨細胞の維持・生存に役割を果たすことが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Dgcr2 contributes to the chondrocytes differentiation by modulating TGF- β signaling

○Kajiwara K

Dept Mol Life Sci, Tokai Univ, Sch Med

It has been suggested that the DGCR2 gene plays a role in the pathogenesis of 22q11.2 deletion syndrome. To analyze its function, we used our Dgcr2-knock-out/EGFP-knock-in mice (Dgcr2-KO mice). At weaning, approximately 50% of Dgcr2-KO mice showed mild skeletal abnormalities with short tail and flat face. Skeletal prep and three-dimensional CT analyses revealed maxillofacial malformation in Dgcr2-KO mice around 6-week-old. In histology, the knock-in EGFP was expressed significantly in cartilage tissues and especially in hypertrophic chondrocytes, whose sparseness was observed in cranial base of Dgcr2-KO mice. Therefore, here we examined the Dgcr2 gene function with the primary cultured chondrocytes from Dgcr2-KO mice. The Dgcr2-KO chondrocytes showed no change in normal condition compared with those from wild-type. However, when TGF-beta was applied to their medium, the Dgcr2-KO chondrocytes changed to fibroblast-like cell shape with expression of type I collagen. Our results suggest that DGCR2 plays roles for maintenance and/or survival of hypertrophic chondrocytes by regulating TGF-beta signaling and that deficiency of DGCR2 in patients of 22q11.2 deletion syndrome could contribute to at least a part of their skeletal symptoms.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C18 軟骨細胞分化と増殖制御における promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) 転写因子の役割について

○内藤 昌子, 笠原 正彰, 大橋 晶子, 高橋 富久

日大 歯 解剖 I

軟骨細胞の形成過程は、肥大軟骨分化に伴い増殖が停止し、分化に関連した細胞周期の調節が厳密になされている。しかしながら軟骨細胞の様々な分化段階で発現する細胞周期調節因子の役割については不明な点が多い。本研究では軟骨前駆細胞株(ATDC5)を用いて、細胞増殖制御因子として知られる zinc finger 型転写因子の PLZF が軟骨細胞の増殖と分化にどのような影響をおよぼすのかを検討した。Insulin で誘導した ATDC5 細胞の分化過程において、軟骨細胞分化の進行にともない PLZF の発現量は増加した。PLZF を過剰発現させると、肥大軟骨細胞の分化マーカー (ALP, MMP13) と cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor である p21 の発現レベルが増加し、軟骨細胞分化の亢進と増殖能の抑制が観察された。PLZF short hairpin RNA (shRNA) を ATDC5 に導入すると、軟骨細胞分化が抑制され、増殖が亢進した。これらの結果から、PLZF は軟骨細胞の分化進行に伴い発現量が増加し、増殖を停止させることで分化成熟を促すことが示唆された。一方、軟骨細胞の増殖を抑制する dexamethasone (Dex) 刺激は PLZF の発現を誘導した。そこで Dex の増殖抑制作用に PLZF が関与するかどうか PLZF shRNA を導入した細胞を用いて解析した。その結果、Dex による CDK inhibitor (p21, p57) や p53 遺伝子の発現誘導を PLZF shRNA は部分的に減少させ、増殖活性を保持したことから、Dex が引き起こす軟骨細胞の増殖抑制に PLZF 遺伝子が関与することが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The roles of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein in chondrocyte differentiation and proliferation

○Naito M, Kasahara M, Ohashi A, Takahashi T

Dept Anat, Nihon Univ Sch Dent

The balance between cell proliferation and cell cycle exit for the initiation of chondrocyte differentiation is tightly regulated by extracellular and intracellular signaling. However, molecular mechanisms underlying this regulation have not been elucidated. In this study, we investigated the expression of the transcription factor promyelocytic leukemia zinc-finger (PLZF), during chondrocyte differentiation in a chondrogenic progenitor cell line, ATDC5. PLZF has been shown to be upregulated during chondrocyte differentiation. To elucidate the roles of PLZF in chondrocyte proliferation and differentiation, ATDC5 cells were transfected with a vector overexpressing PLZF. Results showed that PLZF overexpression suppressed cell cycle progression and promoted differentiation into hypertrophic chondrocytes by inducing the mRNA expression of alkaline phosphatase, matrix metalloproteinase 13, and p21. In contrast, PLZF short hairpin RNA (shRNA) suppressed the differentiation into hypertrophic chondrocytes and promoted cell cycle progression. These results indicate that PLZF promote hypertrophic phenotypes. Meanwhile, Glucocorticoid (GC) inhibits proliferation in growth plate chondrocytes. Treatment with dexamethasone (Dex), a GC analogue, induced PLZF expression in ATDC5 cells. Furthermore, PLZF shRNA attenuated Dex-induced cell cycle arrest by downregulating p21 mRNA expression. These results suggest that GC-induced PLZF upregulation is involved in GC-induced cell cycle arrest by regulating the p21 expression in chondrocytes.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C19 マウス下顎頭軟骨発生過程における Syndecan family の遺伝子発現に関する研究

○藤川 芳織, 高橋 将人, 柴田 俊一

医科歯科大 院医歯 顎顔面解剖

【目的】 Syndecan family は膜貫通型ヘパラン硫酸化プロテオグリカンであり, FGF 等の成長因子と結合することが知られている. 今回は, マウス下顎頭軟骨発生過程における Syndecan 遺伝子の発現を検討した. 【方法】 胎生 14.0-16.0 日齢 (E14.0-16.0) のマウス下顎頭軟骨の連続切片を作成し, 35S-UTP 標識プローブを用いた in situ hybridization を行った. 【結果】 E14.0 の下顎頭軟骨原基は間葉凝集で構成されており, Syndecan1 および 2 mRNA が原基全体で, Syndecan4 の mRNA が原基の一部で発現していた. E15.0 では, 下顎頭軟骨原基の中に最初の軟骨形成が認められ, その一部は肥大化していた. Syndecan1 および 2 mRNA は embryonic zone で弱く発現しており, Syndecan4 mRNA は軟骨全体で発現が認められた. E16.0 では Syndecan1 mRNA が fibrous cell zone から flattened cell zone, Syndecan4 mRNA は polymorphic cell zone から hypertrophic cell zone の上部に発現していた. Syndecan2 および Syndecan3 mRNA は hypertrophic cell zone に弱く発現していた. また, Syndecan1 および 2 mRNA は E14.0 から E16.0 の骨膜および軟骨膜に強く発現していた. 【考察】 以上の結果から, Syndecan 1, 2 および 4 は下顎頭軟骨形成前の段階から軟骨原基に発現し, 軟骨分化に関与していると推測された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Expression of Syndecan family in the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible

○Fujikawa K, Takahashi M, Shibata S

Div Maxillofac Anat, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

We have traditionally been engaged in analyses of structural features of mandibular condylar cartilage. This time, as a part of our routine studies, we investigated the expression of Syndecan family mRNA in the developing condylar cartilage of fetal mouse mandible. ICR mice at E14.0 - 16.0 were used in the present study. Serial sections of condylar cartilage were made, and expression of Syndecan family mRNA was investigated by in situ hybridization with 35S-UTP labeled probes. At E14.0, the anlage of the condylar cartilage was recognized as a mesenchymal condensation and mRNA expression for Syndecan 1, 2 and 4 was detected, but Syndecan 3 was not. At E15.0, mRNA expression for Syndecan 4 was expressed in the newly formed chondrocytes, while Syndecan 1 and 2 was detected in the embryonic zone. At E16.0, mRNA expression for Syndecan1 and 4 was detected in the upper part of condylar cartilage, while Syndecan2 and 3 was detected in the hypertrophic cell zone. Meanwhile, mRNA expression for Syndecan1 and 2 was detected in the periosteum and the perichondrium at E14.0 - 16.0. These results suggest that Syndecan 1, 2 and 4 may be involved in the formation of the mandibular condylar cartilage.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C20 Fam20C 過剰発現マウスの作製とその解析について

○廣瀬 勝俊¹, 佐藤 淳¹, 社領 美紀¹, 野田 百合¹, 小守 壽文², 豊澤 悟¹

¹阪大 院歯 口腔病理

²長大 院医歯薬 細胞生物

【目的】 Fam20C はゴルジ体に局在し, 分泌蛋白質のリン酸化を行うキナーゼで, S-X-E/pS モチーフを有する分泌蛋白質をリン酸化する. SIBLINGs ファミリーに属する骨基質蛋白質は S-X-E/pS モチーフを多数有するため, リン酸化されて負に荷電して Ca²⁺ 結合能を獲得し, 骨の石灰化に関与すると考えられる. 実際, Fam20C は骨基質の osteopontin や Dmp1 をリン酸化する事が *in vitro* で報告されたが, *in vivo* におけるその機序は未だ不明である. そこで, 生体の骨形成における骨基質のリン酸化の役割を調べるため, 骨芽細胞が Fam20C を過剰発現するトランスジェニックマウス (Fam20C-Tg) を作製した. **【材料と方法】** Type1 collagen (2.3kb) promoter 下に Fam20C cDNA を組み込み, 骨芽細胞が Fam20C を過剰発現する Fam20C-Tg を作製した. 生後 4 週齢の Fam20C-Tg と野生型マウス (WT) の片側大腿骨と脛骨から total RNA を抽出し, Real-time PCR により Fam20C の発現量を測定した. 他方の大腿骨は 4% PFA にて浸漬固定後, μ CT にて骨形態計測を行った. また, 頭蓋骨の脱灰標本を免疫染色に用いた. **【結果】** Fam20C-Tg は 4 系統をライン化した. 4 系統の長管骨における Fam20C 発現は WT と比較して約 30 倍~40 倍高かった. 免疫染色により, Fam20C-Tg では骨芽細胞のゴルジ野に Fam20C が過剰蓄積し, 骨基質内にも分布していた. 4 系統の長管骨の μ CT 解析では, WT と比較して, 皮質骨の骨量, 骨幅, 骨密度の減少が認められ, これらの皮質骨の変化はライン化した 4 系統でほぼ同一であったため, 今後, Fam20C 発現量の最も低いものと最も高い Fam20C-Tg を解析する予定である.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Analysis of transgenic mice overexpressing Fam20C in osteoblasts

○Hirose K¹, Sato S¹, Sharyo M¹, Noda Y¹, Komori T², Toyosawa S¹

¹Dept Oral Pathol, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

【Background】 Fam20C is the Golgi-localized protein kinase, which phosphorylates secreted proteins with S-X-E/pS motifs. SIBLINGs family including Dmp1 and osteopontin contains a large number of the motifs. The phosphorylation of these proteins makes them negatively charged, which may recruit of calcium ions and thereby regulating matrix mineralization. It is known that recombinant Fam20C phosphorylated Dmp1 and osteopontin *in vitro*. However, the *in vivo* function of phosphorylated these proteins by Fam20C have remained unknown. To investigate the *in vivo* functions of phosphorylated these proteins, we generated transgenic mice to overexpress Fam20C. **【Materials and Methods】** We generated Fam20C transgenic mice (Fam20C-Tg) with the mouse 2.3-kb *Colla1* promoter, which specifically directs transgene expression to osteoblasts. 4-week-old male Fam20C-Tg and wild type mice (WT) were studied. **【Results and Discussion】** We established four Fam20C-Tg lines. Real-time PCR analysis showed the Fam20C mRNA level were 30 to 40 times higher than that in WT. Immunohistochemical study of Fam20C-Tg showed Fam20C was abnormally accumulated in the Golgi region of osteoblasts and in the bone matrix. μ CT analysis indicated Fam20C-Tg had decreased BT/TV, BMD and thickness of cortical bone. We are going ahead to study the two Fam20C-Tg lines with the lowest transgene expression and with the highest one.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C21 ヒト歯科インプラント周囲顎骨におけるマイクロ/ナノ構造特性

○松永 智¹, 是澤 和人^{1,2}, 小高 研人^{1,2}, 廣内 英智¹, 森田 純晴^{1,2}, 山口 朗²,
阿部 伸一¹

¹東歯大 解剖

²東歯大 口科研

【目的】 歯を有する顎骨では、歯根膜を介して咬合力をはじめとする力学的負荷が内部骨梁に伝達する。一方、歯科インプラントは顎骨と直接結合し、インプラント体周囲に新たな骨が形成される。インプラント負荷にともなう骨梁構造の変化について多くの報告があるが、その多くは実験動物によるもので、ヒトのインプラント周囲顎骨における骨動態を詳細に解析した報告は極めて少ない。そこで、本研究ではヒトインプラント周囲顎骨のマイクロ/ナノスケールにおける構造的特性を解析し、力学的環境との関連性を解明することを目的とした。【方法】 長期使用された歯科インプラントを有するヒト下顎骨から、右側第二大臼歯部のインプラント体を含む試料体を採取した。マイクロクラックを確認するためのBulk染色を施し、100 μmの研磨標本を作製して、光学顕微鏡にてマイクロクラックとオステオンの分布および走行を検索した。また微小領域X線回折法を用いた骨質解析を行い、部位別の生体アパタイト(BAp)結晶配向性を検討した。【結果】 インプラント体周囲にはオステオンが多く存在し、本来の海綿骨領域に皮質骨様の構造がすると同時に、その走行には異方性が認められた。オステオンは、インプラント近傍においてインプラント体と平行に走行しており、その一方でインプラント体から離れた領域において、近遠心方向に走行していた。微小骨折は多くは確認できず、インプラント体から離れた場所に認められた。BAp結晶は、インプラント周囲においてはオステオンの走行方向に優先配向していたが、下顎体下縁部においては近遠心方向への優先配向性がみられた。【考察】 インプラントに加わる力学的負荷にともない、インプラント周囲顎骨は海綿骨から皮質骨様に構造特性を獲得していることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Micro/nano structural properties in peri-implant jaw bone of human cadaver

○Matsunaga S¹, Koresawa K^{1,2}, Odaka K^{1,2}, Hirouchi H¹, Morita S^{1,2}, Yamaguchi A², Abe S¹

¹Dept Anat, Tokyo Dent Coll

²HRC, Tokyo Dent Coll

The aim of this study was to clarify the micro/nano structure relevance to mechanical properties by investigating osteon anisotropy and alignment of biological apatite (BAp) crystallites in human peri-implant jaw bone. The mandible with dental implants was removed from the cadaver of a woman donated for dissection. After bulk stain to detect micro-cracks, resin blocks were prepared, and the ground sections with 100 μm in thickness were made. The distribution and orientation of micro-cracks and osteons surrounding implant were analyzed microscopically, and the crystalline orientation was quantitatively assessed by a microbeam X-ray diffractor with a reflection-based optical system using Cu-Kα beams and a transmission-based optical system using Mo-Kα beams (reflection system: RINT2500). Osteons were distributed in parallel with longitudinal axis of the implant body at peri-implant bone area. A few micro-cracks were preferentially observed at area just away from implant body, but there were few micro-cracks at bone area facing to the implant. Preferential alignment of BAp was seen in regions surrounding implant. These results suggested that changes to load environment resulting from dental implant treatment induced the unique structural properties at micro/nano levels in peri-implant jaw bone.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C22 (演題取り下げ)

O1-C23 骨代謝マーカーと自己血液由来 PRP 派生物質による再生の基礎と臨床

○奥寺 元

東京形成歯科研究会

近年歯科臨床は口腔インプラントの応用によって大きく変革の時期を迎えている。従来型の歯科診療にはない効果が期待されての応用である。それは、単なる異物感がないものであるとか、よく噛めるものであるとかと言う事だけでない。すなわち、インプラントの埋入で周辺組織の維持や骨再生における Scafford の役目を行い生体変化上意義がある。そのような意義のある存在であるが、肝心の骨再生に関していろいろな素材や手法があるがそれらは疑似骨様物質の領域を出ない、はたまたインプラントの長期保全を阻害する確固たる原因が証明されていないのが現状ではないだろうか？ 未だ発展途上のインプラント臨床を基礎分野とコラボレーションをしながら、現状打開をしなければ信頼される歯科臨床は構築されない。私共、公益法人日本口腔インプラント学会認定施設一般社団法人東京形成歯科研究会は解明できない基礎分野を取り入れながら臨床に向かっている。その一部硬軟組織再生のための自己血液由来 PRP 派生により再生、より生体に即した骨補填材・骨代謝マーカーとインプラント脱落のかかわりを取り組んでいるのでその分野を発表したい。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Basic and clinical reproduction by bone metabolism marker and self-blood-derived PRP derived substance

○Okudera H

Tokyo Plastic Dental Sosity

Conventional dental not in effect of an application of is expected. It is not the only thing to say whether the one in which chewable thing or well just a foreign body sensation is not. In other words, there is a biological change on the significance do the role of in the maintenance and bone regeneration of the surrounding tissue in the input embedding of the implant. Although the presence there of such significance, but there are a variety of materials and techniques in relation to essential of bone regeneration, they do not leave the area of the pseudo-bone-like substance, also is firm reason to inhibit the long-term conservation of the implant flop or will not in the current situation is not proven. Yet while the cooperation of the implant clinical of developing the basic fields, dental practice that is trusted to be the breakthrough will not be built. Part hard and soft tissue self-blood-derived PRP derived by regenerative medicine for playback, so are working the bone filling material, bone turnover markers and the involvement of the implant falling out in line with the more biological want to announce that field.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C24 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に於ける亜鉛イオンによる過分極応答

○光 夢凱, 吉田 卓史, 中村 卓史, 若森 実

東北大 院歯 歯科薬理

亜鉛はヒトのからだにも微量ながら含まれており、鉄などとともに生体内必須微量元素と呼ばれている。亜鉛は核酸・蛋白質・糖・脂質代謝や DNA・RNA の合成に関与する酵素に不可欠で、生体機能に重要な役割を果たしている。亜鉛の 90% は骨や筋肉に存在するが、海馬 CA3 領域のシナプス間隙では活動電位の発生に伴い亜鉛イオン (Zn^{2+}) がシナプス終末から遊離されて、間隙での Zn^{2+} 濃度は 100 μ M 以上になる。 Zn^{2+} は NMDA 受容体や P2X 受容体などのイオンチャネルの機能を修飾すると報告されている。従って、本研究では骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞にパッチクランプ法ホールセル法を適用し、イオンチャネルに対する Zn^{2+} の効果を検討した。ホールセル法形成後、膜電流固定法に切り替え細胞の静止膜電位を記録すると -7.7 ± 0.7 mV ($n=25$) であった。150 ms 5 pA の過分極電流を 0.1 Hz で注入しながら 1 mM Zn^{2+} を投与すると、2つのグループに分けられる過分極応答が記録できた。 -6.1 ± 0.6 mV の膜電位が膜抵抗の上昇を伴い -14.2 ± 1.1 mV ($n=9$) まで過分極したグループと、 -8.5 ± 1.1 mV の膜電位が膜抵抗の低下を伴い -64.6 ± 1.3 mV ($n=16$) まで過分極したグループに分類できた。後者のグループの細胞を膜電位固定下にランプ波形を用いて電流-電圧関係を記録すると、逆転電位は -69.1 ± 1.3 mV ($n=14$) であり、内外液の組成から計算される K^+ の平衡電位 ($= -58 * \log(155 / 5) = -86.5$ mV) に近い値を示した。従って、細胞外に投与した Zn^{2+} が K^+ チャネルを開口し、膜を過分極させることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Hyperpolarizing responses by Zn^{2+} in osteoblastic MC3T3-E1 cells

○Guang M, Yoshida T, Nakamura T, Wakamori M

Div Mol Pharmacol Cell Biophys, Dept Oral Biol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Zn^{2+} is an essential mineral element for maintaining homeostasis. 90% of zinc exists in bones and muscles, but Zn^{2+} in the synaptic vesicle is released from synaptic terminals following depolarizing stimuli. The released Zn^{2+} in the synaptic cleft modulates NMDA and P2X receptors channels. Here we have examined the Zn^{2+} effects on ion channels expressed in osteoblastic MC3T3-E1 cells by using the patch-clamp technique. Under current-clamp mode, we measured membrane potential. After formation of the whole-cell mode, resting membrane potential was -7.7 ± 0.7 mV ($n=25$). We recorded two types of Zn^{2+} responses. Zn^{2+} hyperpolarized MC3T3-E1 cells from -6.1 ± 0.6 mV to -14.2 ± 1.1 mV ($n=9$) with an increase of membrane resistance. On the other hand, Zn^{2+} hyperpolarized MC3T3-E1 cells from -8.5 ± 1.1 mV to -64.6 ± 1.3 mV ($n=16$) with a decrease of membrane resistance. In the latter group, the reversal potential was -69.1 ± 1.3 mV ($n=14$), which was closed to the calculated equilibrium potential of K^+ . These data suggest that extracellular Zn^{2+} activates K^+ channel, and hyperpolarizes MC3T3-E1 cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-C25 ヒト口腔癌細胞株における TRP チャンネルの機能解析

○合島怜央奈^{1,2}, 吉本 怜子³, 曹 愛琳^{1,4}, 森 啓輔², 張 旌旗⁴, 大崎 康吉⁴,
檀上 敦², 山下 佳雄², 清島 保³, 城戸 瑞穂¹

¹佐賀大 医 組織神経解剖

²佐賀大 医 歯科口腔外科

³九大 院歯 口腔病理

⁴九大 院歯 分子口腔解剖

TRP (transient receptor potential) チャンネルは温度や化学物質, 浸透圧変化などの多様な刺激に応答する Ca^{2+} 透過性の高い非選択的陽イオンチャンネルである. がん細胞における TRP チャンネルの発現や機能異常の報告があるが, 口腔癌での役割は不明な点が多い. 口腔内は TRP チャンネルの活性化を引き起こす多様な刺激環境にあり, 口腔癌における TRP チャンネルの発現と機能的役割について解析した. 口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4) ではヒト正常皮膚上皮細胞株 (HaCaT) と比較し, TRPV3 チャンネルが高く発現していた. 高分化型口腔扁平上皮癌である HSC4 では TRPV4 チャンネルの発現が mRNA およびタンパクレベルで高かった. 口腔癌細胞株へ TRPV3 および TRPV4 のアゴニストを添加すると細胞内カルシウム濃度が上昇した. HSC4 への TRPV4 アゴニスト投与では HSC2 や HSC3 と比較して高いカルシウム応答が確認された. TRPV4 アゴニスト投与によりストレス応答性 MAPK 経路である p38 や JNK シグナルのリン酸化が促進された. siRNA を用いて TRPV4 のノックダウンを行うと細胞間接着の重要な因子である E-cadherin や β -catenin の発現が減弱した. 以上より口腔内環境や癌微小環境が機能的な TRP チャンネルを介して, 口腔癌の病態形成に重要な影響を与えることが示唆された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Analysis of TRP channels in human oral squamous cell carcinoma

○Aijima R^{1,2}, Yoshimoto R³, Cao AL^{1,4}, Mori K², Zhang JQ⁴, Ohsaki Y⁴, Danjo A²,
Yamashita Y², Kiyoshima T³, Kido M¹

¹Div Histol & Neuroana, Fac Med, Saga Univ

²Dept Oral & Maxillofac Surg, Fac Med, Saga Univ

³Sect Oral Pathol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

⁴Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

TRP (transient receptor potential) channels are Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels that are responsive to a various environmental stimuli such as temperature, chemicals, or osmotic stress. Several studies have reported abnormal expression and/or activity of the TRP channels in cancer cells. However, little has been reported on the role of TRP channels in oral cancer. The oral cavity experiences drastic variation stimuli, which can active TRP channels. In this study, we investigated functional expression and the roles of TRP channels in oral cancer. TRPV3 mRNA was more highly expressed in human oral squamous cell carcinoma (OSCC; HSC2, HSC3, HSC4) than a human normal skin keratinocytes (HaCaT). HSC4, well-differentiated squamous cell carcinoma, the most highly expressed TRPV4 at mRNA and protein levels. TRPV3 and TRPV4 agonists increased intracellular Ca^{2+} concentration in oral cancer cells. Furthermore, application of the TRPV4 agonist significantly increased intracellular Ca^{2+} concentration in HSC4 compared with HSC2 and HSC3. TRPV4-agonist stimulation led to increased p38 and JNK phosphorylation in OSCCs. Finally, TRPV4-knocked down HSC4 by siRNA decreased the expression of key component of adherence junction. These results suggested that environment of the oral cavity or tumor microenvironment affected pathological OSCCs via TRP channels.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D1 癌の増殖における非(低)カルボキシル化オステオカルシンの機能

○林 慶和^{1,4}, 川久保-安河内 友世², 倉谷 顕子^{1,3}, 中村 誠司⁴, 平田 雅人¹

¹九大 院歯 口腔細胞工学

²福岡大 薬 免疫・分子治療

³九大 院歯 OBT 研究セ

⁴九大 院歯 顎顔面腫瘍制御

オステオカルシン (OC) は骨芽細胞が分泌する骨基質タンパク質であり、3つのグルタミン酸残基がカルボキシル化された Gla 型 OC (GlaOC) と非(低)カルボキシル化状態の Glu 型 OC (GluOC) の2種がある。大部分の OC は GlaOC として骨基質に埋め込まれるが、わずかな量は血液中にも存在する。また、骨代謝の過程で一部は脱カルボキシル化されて、GlaOC, GluOC 共に体内を循環している。OC が個体の骨代謝レベルを反映することから、癌の骨転移では OC が血中高値を示し骨転移マーカーになるという報告もあるが、癌の病態におけるオステオカルシンの役割は未解明な部分が多い。まず、癌の病態における OC の役割について解析したところ、GlaOC は細胞増殖を促進したが GluOC は細胞増殖を抑制した。すなわち、癌の病態において GlaOC と GluOC の作用が相反していた。そこで、GluOC の抗腫瘍効果に着目し、*in vitro* および *in vivo* での解析を行った。

マウスメラノーマ細胞株 (B16) に GluOC を添加し、WST-8 法および BrdU 法にて細胞増殖能を調べたところ、細胞増殖を抑制した。GluOC による増殖抑制のメカニズムを調べるため、受容体型チロシンキナーゼ (RTK: Receptor Tyrosine Kinase) リン酸化アレイを用いて各種 RTK のリン酸化レベルについて解析したところ、GluOC は複数の RTK のリン酸化レベルを抑制した。このことから、GluOC の抗腫瘍効果は複数の RTK のリン酸化レベルの抑制を介していることが示唆された。次に、B16 を皮下移植した C57BL/6 担癌雌マウスに対して、徐放性浸透圧ポンプを用いて GluOC を継続投与したところ、GluOC 投与群ではコントロール群と比べ有意に腫瘍径が小さくなり腫瘍も軽量であった。また、組織学的解析により、投与濃度依存的に腫瘍組織において OC を検出した。このことから投与した GluOC が直接癌の増殖を抑制したことが示唆された。

以上より GluOC が複数の RTK のリン酸化レベルの抑制を介して抗腫瘍効果を表すことが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Functions of uncarboxylated osteocalcin in cancer progression

○Hayashi Y^{1,4}, Kawakubo-Yasukochi T², Kuratani A^{1,3}, Nakamura S⁴, Hirata M¹

¹Sect Mol Cell Biochem, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Dept Immunol Mol Pharmacol, Fukuoka Univ Pharm Sci

³OBT Res Cent, Kyushu Univ Grad Sch Dent

⁴Sec Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Osteocalcin (OC), an osteoblast-derived peptide hormone, is present in general circulation as both carboxylated (Gla) and uncarboxylated (Glu) forms, and serum OC level is thought to be an index of the properties of bone. Recent studies demonstrated that high circulating OC levels constitute a marker for bone metastasis in prostate cancer patient. However, there is no evidence on a mechanistic basis that OC directly deteriorates pathological status of the cancer.

In this study, we first demonstrated that cancer growth was accelerated by GlaOC, but suppressed by GluOC. The anti-tumor mechanism of GluOC was then investigated, focusing on B16 melanoma cells. As a result, GluOC suppressed tumor growth *in vivo*, as well as *in vitro*, and administrated OC was detected in tumor region. In addition, Phospho-Receptor Tyrosine Kinase Array analysis revealed that GluOC reduced the phosphorylation levels of several receptor tyrosine kinases.

These results indicate that GluOC induces anti-tumor effects by inhibiting receptor tyrosine kinase activities.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D2 ヒト大腸癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌における Arl4c の発現とその機能解析

○藤井 慎介¹, 松本 真司²

¹九大 院歯 口腔病理

²阪大 院医 分子病態生化

私共は、最近、Wnt/ β -catenin と EGF シグナルの協調的な活性化により発現が誘導され、上皮細胞集団の形態形成を制御する遺伝子として低分子量 G タンパク質 Arf-like small GTP-binding protein (Arl4c) を同定した。多くの癌において Wnt/ β -catenin または EGF/Ras-MAPK シグナルの異常活性化が生じているが、これまで、Arl4c の癌における発現と機能については不明であった。本研究では、癌における Arl4c の発現とその機能について検討することを目的とした。免疫組織学的に Arl4c がヒト大腸・肺腺癌症例において腫瘍組織特異的に高頻度で過剰発現しており、*in vitro* および *in vivo* の実験系において、その発現はこれらの癌細胞の腫瘍形成に必要であることを見出した。また、大腸・肺腺癌細胞株において、Arl4c の発現は増殖因子 (Wnt/ β -catenin および Ras/MAPK) シグナルに依存していた。また、Arl4c は免疫組織学的に高頻度に肺扁平上皮癌 (SCC) においても高発現していた。肺 SCC 細胞株では Arl4c を高発現しており、その発現は増殖因子シグナルに依存しておらず、Arl4c 遺伝子の 3' 非翻訳領域の CpG が低メチル化状態であった。DNA 脱メチル化酵素 (TET) は DNA の脱メチル化を促進するが、肺 SCC 細胞株において TET をノックアウトすると Arl4c 遺伝子 3' 非翻訳領域のメチル化が亢進し、Arl4c の発現が減少した。これらの結果から Arl4c は種々の癌腫において高頻度に高発現し、その発現は増殖因子シグナルまたは DNA のメチル化に制御され、癌形成に関与する新たな癌の分子標的となりうる可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Arl4c expression and its involvement in tumorigenesis of colorectal cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma

○Fujii S¹, Matsumoto S²

¹Sect Oral Pathol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Dept Mol Biol Biochem, Osaka Univ Grad Sch Med

We recently demonstrated that expression of Arl4c, an Arf-like small GTP-binding protein, induced by a combination of Wnt/ β -catenin and EGF signaling promotes epithelial tubulogenesis. Abnormalities in Wnt/ β -catenin and EGF/Ras-MAPK signaling are involved in various human cancers, however, roles of Arl4c in tumorigenesis are not understood. Arl4c was highly expressed at high frequencies in colorectal and lung adenocarcinomas immunohistochemically. In these adenocarcinoma cells, knockdown of Arl4c inhibited proliferation capabilities *in vitro* and *in vivo*. Inhibition of Wnt/ β -catenin and Ras/MAPK signaling reduced Arl4c expression in colorectal and lung adenocarcinoma cancer cells. We also found that Arl4c was strongly expressed at high frequencies in lung squamous cell carcinoma (SCC). Inhibition of Wnt/ β -catenin and Ras/MAPK signaling did not affect Arl4c expression in lung SCC cells, but lung SCC cells showed high Arl4c expression with DNA hypomethylation of Arl4c gene. Knockout of ten-eleven translocation (TET) reduced 5hmC levels and Arl4c expression in lung SCC cells. These results suggest that Arl4c could be a new molecular target for cancer therapy, and its expression would be regulated by growth factor signalings or DNA methylation status. We are currently clarifying the mechanism that induces Arl4c expression through DNA methylation modifications.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D3 SCF ^{β -TRCP} 依存的な FNIP2 タンパク質の量的変化は mTORC シグナル制御と BHD 症候群の病態発症に寄与する

○永畷 勝之^{1,2,3}, 福島 秀文¹, 星川 聖良¹, 綿引 麻美¹, 福本 敏¹, 岡部 幸司²

¹東北大 院歯 先端再生医学

²福歯大 歯 細胞生理

³福歯大 歯 口外

【目的】 Fibrofolliculoma, 腎腫瘍, 肺嚢胞の3徴が知られる Birt-Hogg-Dube (BHD) 症候群は, 頭頸部では多発性皮膚丘疹を呈する常染色体優性の遺伝性疾患であり, FLCN, FNIP1, FNIP2 から構成される BHD 複合体分子の機能不全により腫瘍化が引き起こされていることが明らかになってきている. そこで SCF ^{β -TRCP} による FNIP2 タンパク質の量的制御機構が, 細胞の増殖や腫瘍化に及ぼす影響を検討したので報告する.

【結果】 これまでに報告されている BHD 複合体分子の遺伝子改変動物の解析から, BHD 複合体の mTORC シグナルとの関連が示唆されている. そこで我々は, BHD 複合体が, 細胞内の栄養状態の変化に応じてどのように FNIP2 タンパク質の量的制御を行い, mTORC シグナルを調節しているか検討した. その結果, 細胞の低栄養状態で引き起こされる FNIP2 の安定化は, BHD 複合体をリソソーム近傍へ誘導する一方, mTOR のリソソームへの局在化および mTORC 活性を減弱させた. アミノ酸刺激により誘導される SCF ^{β -TRCP} を介した FNIP2 の不安定化は, BHD 複合体をリソソームから解離させ, mTOR のリソソームへの局在化と mTORC シグナルの活性化を誘導した. また, これらの細胞を用いた細胞増殖および腫瘍移植実験を行ったところ, FNIP2 の安定化は細胞の増殖・腫瘍形成を抑制し, 対照的に FNIP2 の不安定化は細胞の増殖・腫瘍形成を促進した.

【考察】 BHD 複合体と mTORC シグナルは, SCF ^{β -TRCP} 依存的な FNIP2 の分解を介して拮抗的に作用しており, BHD 複合体の機能不全による mTORC シグナルの活性化が, BHD 症候群における異常な細胞増殖を引き起こしていると示唆された. (会員外共同研究者: 犬塚博之)

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

β -TRCP-mediated FNIP2 degradation to control Birt-Hogg-Dube (BHD) complex and modulate mTORC activity involved in the onset of BHD syndrome

○Nagashima K^{1,2,3}, Fukushima H¹, Hoshikawa S¹, Watahiki A¹, Fukumoto S¹, Okabe K²

¹Cent Adv Stem Cell & Regen Res, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Div Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll

³Div Oral Surg, Fukuoka Dent Coll

Birt-Hogg-Dube (BHD) syndrome is a genetic disorder susceptible to kidney cancer, renal and pulmonary cysts, and noncancerous tumors of the hair follicles called fibrofolliculomas in head and neck area. Folliculin (FLCN) and FLCN-interacting proteins 1 and 2 (FNIP1 and FNIP2) form the BHD complex, which acts as a tumor suppressor for kidney cancer, and its dis-function is frequently found in BHD syndrome. Here, we demonstrate that the protein stability of FNIP2 is regulated by SCF ^{β -TRCP}, and the SCF ^{β -TRCP}-mediated FNIP2 degradation in BHD complex triggered by amino acid stimulation leads to the mTORC activation through recruiting mTOR to lysosome. We further find that blocking the degradation of FNIP2 via β -TRCP knockdown or expression of a stable FNIP2 mutant abrogates recruitment of mTOR to lysosome, thereby hindering the activity of the mTORC1 signaling pathway. Consistent with these findings, non-degradable-FNIP2-expressing cells are less tumorigenic in mouse xenograft experiments. These findings suggest that development of BHD syndrome may be caused in part by aberrant FNIP2 degradation pathway contributing to elevated mTORC activity.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D4 Kruppel-like factor 5 遺伝子発現の必要最小領域と Sp3 の関与

○美原 希美

日歯大 生命歯 生化

Kruppel-like factor 5 (KLF5) は上皮細胞の増殖・分化バランスをコントロールし、その発現が口腔癌の進行と密接に関連する。KLF5 遺伝子の転写機構を解明することが口腔癌患者の予後改善に繋がると期待されるが、そのほとんどは不明である。本研究では、KLF5 発現に不可欠な遺伝子プロモーターの必要最小領域 (minimal essential region, MER) とそれを制御する転写因子について解析した。様々な長さのプロモーター領域をもつコンストラクトを作製しレポーターアッセイを行ったところ、転写開始点近傍に存在し 6 つの GC box (GC1-GC6) をコードする 186 bp 長の領域 (+145~+330) が MER であり、GC box のミュータントを用いたアッセイの結果から GC1 が最も重要なエレメントであることが明らかになった。GC box 結合転写因子である Sp1, Sp3, Sp4 と MER との結合をクロマチン免疫沈降法で検討したところ、Sp3 が MER と GC1 に対する主要転写因子であることが示された。これらの結果は、Sp-GC box の結合に対するインヒビターと Sp siRNA により確認された。また、Sp3 は KLF5 を発現する口腔上皮組織基底細胞に強く発現していた。以上より、転写開始点近傍の 186 bp が MER であり、GC1 と Sp3 の結合が口腔癌細胞における KLF5 発現の基本因子である可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Minimal essential region required Kruppel-like factor 5 expression and the regulation by Sp3

○Mihara N

Dept Biochem, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Kruppel-like factor 5 (KLF5) transcriptionally regulates gene expression involved in proliferation-differentiation balance of epithelial cells, and its aberrant expression associates with progression of oral carcinomas. Although it suggests a contribution of understanding a mechanism of KLF5 gene transcription to improve the patients' prognoses, the mechanism is uncertain. In this study, we examined the minimal essential region (MER) required for a basal expression of KLF5 and the regulatory transcription factors. Reporter assays using plasmids with various lengths of KLF5 promoter region showed that a 186 bp region (+145-+330) near the transcription start site and clustering six GC boxes (GC1-GC6) was the MER and that GC1 was a most essential element to express KLF5. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays about Sp1, Sp3 and Sp4 that can bind to GC boxes exemplified a predominant binding of Sp3 to GC1. Sp3 protein was immunolocalized at basal cells of oral epithelium that also express KLF5. These data were supported by chemical inhibition of Sp-GC box binding and siRNAs against Sp genes. These results demonstrate that the 186 bp region is the MER and Sp3-GC1 binding is a critical determinant for KLF5 expression.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D5 ユビキチン・プロテアソーム系による染色体パッセンジャー複合体タンパク質 Borealin の発現制御機構とその意義

○常松 貴明, 工藤 保誠, 山田安希子, 新垣理恵子, 石丸 直澄

徳大 院医歯薬 口腔分子病態

細胞分裂では、染色体がダイナミックに形態を変化し、均等に分配される。その制御機構の異常は不均等な染色体分配を引き起こすことから、癌でみられる染色体不安定性の主たる原因と考えられている。細胞分裂の中心的役割を担う染色体パッセンジャー複合体は、Aurora-B キナーゼ、Borealin, Survivin および INCENP の4つの構成因子よりなり、種々の癌組織において、これらの構成因子の過剰発現が報告されていることから、癌との関連や治療標的として着目されている。しかし、これらのタンパクの発現制御機構は未だ明らかとなっていない。本研究では、Borealin タンパクの発現制御機構に着目し、検討を行った。その結果、Borealin タンパクが細胞周期依存的に APC/C^{Cdh1} (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) ユビキチンリガーゼ複合体によってユビキチン化され、分解されることを見出した。さらに、その分解制御機構の詳細を明らかにした。また、培養細胞株への Borealin の過剰発現は染色体数の著明な増加を誘導し、癌化に関与することも見出した。以上より、Borealin のタンパク量の適切な制御は染色体数の恒常性維持に必須であり、染色体不安定性を防ぐ重要な機構である可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Ubiquitin proteasome pathway regulates Borealin stability and its significance

○Tsunematsu T, Kudo Y, Yamada A, Arakaki R, Ishimaru N

Dept Oral Mol Pathol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

Cell division is the most fundamental event. In this event, mitosis is remarkable phase which cells undergo dynamic changes in their structure and physiology. Therefore, deregulation of mitosis induces genomic instability. During mitosis, chromosome passenger complex (CPC) plays an important role in the proper chromosome segregation. CPC is composed by Aurora-B kinase, Borealin, Survivin, and INCENP. It has been reported that CPC proteins are frequently overexpressed in various cancers. However, the regulation of CPC proteins expression remains unclear. Therefore, in this study, we focused on the regulation of Borealin protein. We found that Borealin protein was ubiquitylated by APC/C^{Cdh1} (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) ubiquitin ligase complex. Moreover, we clarified the detailed regulation of ubiquitylation of Borealin protein. Ectopic overexpression of Borealin induced aneuploidy. These findings suggest that the proper regulation of Borealin protein may be essential for genomic stability to prevent from chromosome breakage and/or aneuploidy.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D6 多段階癌抑制分子のケモカイン CXCL14/BRAK は扁平上皮組織の分化制御分子か？

○生駒 丈晴¹, 陽 暁艶^{2,3}, 小澤 重幸¹, 前畑洋次郎², 畑 隆一郎^{2,3}

¹神歯大 院歯 顎顔面外科

²神歯大 院歯 口腔科学

³神歯大 院歯 口腔難治疾患研

【目的】扁平上皮組織では、基底細胞層に存在する組織幹細胞が増殖・分化をしながら上層へと移動する。この過程で幹細胞は有棘細胞、顆粒細胞となり、最終的に角化する。すなわち角化とは上皮細胞の分化過程である。ケモカイン CXCL14/BRAK (以下 CXCL14) は扁平上皮癌組織において発現が低下、あるいは消失する遺伝子で、我々によって癌抑制分子であることが最初に報告された。癌は発癌、増殖、転移と多段階で進展していくが、この過程には多くの遺伝子が関与する。興味あることに、CXCL14 はこれらのすべての段階を抑制する多段階癌抑制分子であることを我々は最近明らかにした。癌細胞は正常細胞と比較し、低分化な状態であり、低分化の細胞では CXCL14 は発現しない遺伝子という仮説に基づき、CXCL14 の遺伝子発現レベルと上皮細胞の分化の関連について検討した。【方法】免疫染色法を用いて、正常上皮組織における CXCL14 の局在を検討した。また扁平上皮癌細胞株 HSC-3 に上皮細胞の分化誘導刺激を加えて、マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析を基に、ナラプロテクトロノロジーと共同研究を行い、CXCL14 の遺伝子発現上昇に関与する候補転写因子群の検索を行った。【結果】免疫染色を行った結果、正常上皮組織において、主に有棘細胞層で CXCL14 の発現が確認された。また上皮細胞の分化誘導刺激を加えると著しい CXCL14 の遺伝子発現上昇とともに、上皮細胞の分化マーカー分子であるトランスグルタミナーゼやインボルクリンの遺伝子発現上昇が確認された。また CXCL14 の遺伝子発現上昇にカルモジュリン-SP1 シグナルが重要であることを見出した。【考察】CXCL14 は分化傾向を示す部位で発現することが確認された。CXCL14 は癌抑制分子として見出されたが、本来、上皮の分化を制御する分子の可能性が示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Is chemokine CXCL14, a multi-step tumor suppressor, a differentiation regulator of squamous epithelial cells ?

○Ikoma T¹, Yang X^{2,3}, Ozawa S¹, Maehata Y², Hata R^{2,3}

¹Dept Oral Maxillofac Surg, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

²Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

³Oral Health Sci Res Center, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

Background: Epithelial basal cell layer is comprised of immature keratinocytes. Cell-cell contact is known to be a critical regulator of cellular differentiation and motility. CXCL14 is a chemokine that is expressed in various normal tissues but is absent or least expressed in cancerous tissues. In this connection, CXCL14 is rarely expressed in immature cells, we determined whether or not cell adhesion signaling, induced by high cell density culture up-regulates the expression of CXCL14 and differentiation markers in squamous epithelium. **Observation:** CXCL14 protein was immunohistochemically detected in middle layer of the epithelium, which was considered to be differentiating keratinocytes. We determined effect of cell adhesion signaling in differentiation of keratinocytes. CXCL14 mRNA was up regulated when the number of cells in culture was increased, and this accompanied by increase in cell differentiation markers for squamous epithelium. We previously reported that GC box, which was important for the expression of CXCL14 mRNA, binds SP-1 transcription factor located on 14 bp upstream of the transcription start site of CXCL14 gene. Interestingly, CXCL14 mRNA up-regulation by cell adhesion signaling was inhibited by sh-RNA against SP-1. **Conclusion:** We propose the possibility that CXCL14 is a new differentiation marker and a regulator of epithelial cell differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D7 舌粘膜表在性病変における発癌 Field 解析

○添野 雄一

日歯大 生命歯 病理

【目的】口腔・消化管粘膜では不顕性の上皮形質変化が蓄積して発癌素地となる Field 発癌機序が知られている。本研究では、舌粘膜上皮における異型変化の検出と病態の把握を目的として、全摘切除検体の病理組織診断と免疫表現型解析に基づく異型上皮マッピングを行った。【材料と方法】当大学附属病院において全摘切除が施行された舌粘膜表在性病変（20 症例）について、切除検体を 3 mm 幅で割断し、各割断面の薄切片を作製、連続する切片に対し HE 染色、サイトケラチン 13 (CK13)/Ki67 多重免疫染色、p53 免疫染色を行った。染色像はバーチャルスライドにてデジタル化し、上皮層を 0.5 mm 幅に区画化した各解析ユニットの HE および免疫染色所見に基づいて異型判定を行い（判定結果を色で識別）、検体全域での異型上皮の地理的分布として復元した。【結果と考察】HE 異型マップでは病変範囲の概要が得られ、CK13/Ki67 異型マップを組み合わせることで高異型度細胞集団が単中心性または多中心性に展開する様子が確認できた。さらに、上皮層の p53 陽性核局在マップを加えると、基底層での点在、連続局在、および陰性判定となる領域が区別できた。HE および CK13/Ki67 異型分布と重ねて比較してみると、検体毎の p53 発現局在パターンの違いから病態を 2 群に大別することができた。結論として、今回開発した異型上皮マッピング法は健常上皮から浸潤癌への形質の変遷と異型上皮の広がりをも示すことができ、舌表在性病変の病態識別に有用であった。p53 表現型の領域性と HE 組織所見・CK13/Ki67 表現型との照合により上皮異型の成立・側方伸展機序の理解が進むと考えている。【共同研究者】日歯大・生命歯・病理 辺見卓男、日歯大・附属病院・口腔病理診断 柳下寿郎

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Topographical mapping of premalignant epithelium on excised tongue mucosal lesions

○Soeno Y

Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Cancer-suspected mucosa comprise the precancerous field of epithelium. We aimed to develop a mapping approach to evaluate premalignant epithelial properties in the area of whole excised specimens. Tongue specimens from patients suspected to have early-stage carcinoma (n=20) were dissected into 3-mm pieces, thin sectioned, and stained by hematoxylin-eosin (HE) and immunohistochemistry (IHC) for Ki67 and cytokeratin 13 (CK13). For analysis, the entire epithelial region was segmented into units of 0.5 mm width. According to HE histology, each unit was defined as either normal or atypical. In parallel, IHC-based phenotypes were classified into four color grades based on Ki67 and CK13 expression profiles. These defined units were arranged to build comprehensive HE and IHC maps. Considering the most advanced atypical region, we could distinguish the modality of atypism, namely, the presence of a mass (monocentric) or multiple foci (multi-centric) of atypical regions within the specimen. Additional analysis for p53 expression disclosed diverse p53-positive backgrounds relative to local HE/IHC phenotypes. Topographical mapping combined with routine HE and IHC is a fruitful technique to comprehend the premalignant property of excised oral mucosal lesions.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D8 血液型抗原 Lewis y による口腔扁平上皮癌の悪性形質制御機構

○浜村 和紀, 戸苺 彰史

愛院大 歯 薬理

【目的】 口腔癌の約 90%以上を占める扁平上皮癌の現在の主な治療法として、手術療法、化学療法および放射線療法が施行されているが、治療に難渋することが多く、十分に癌を制御できるような治療法が確立されているとは言いがたい。最近、私たちは、口腔扁平上皮癌において特異的に発現する糖鎖として、血液型抗原 Lewis y を同定した。これは、正常な扁平上皮では発現していないが、癌になると発現し、悪性度が高くなるにつれて減弱することが明らかになった。そこで今回は、Lewis y がどのような分子機構で、口腔扁平上皮癌を制御しているかについて検討した。

【材料および方法】 7種類の口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、抗 Lewis y 抗体、抗 EGFR 抗体および抗チロシンリン酸化抗体 (PY20) でイムノブロッティングを行った。Lewis y 陰性の口腔扁平上皮癌細胞系株に fut1 ($\alpha 1-2$ フコース転移酵素) を発現させた Lewis y 高発現細胞株を用いて、EGF 刺激後の EGFR のリン酸化の変化を検討した。【結果】 口腔扁平上皮癌細胞における Lewis y 構造をもつタンパク質として、EGFR が同定され、7種類の口腔扁平上皮癌細胞株において、EGFR 上の Lewis y 構造の多少とそのリン酸化レベルとの間に逆相関があることが判明した。さらに、Lewis y 高発現細胞株では、Lewis y 欠損細胞株と比較して、EGF 刺激による EGFR のリン酸化が抑制され、細胞増殖および浸潤能が低下した。【結論】 口腔扁平上皮癌において、Lewis y が EGFR へのリン酸化を抑制することが示された。Lewis y 構造の付加による EGFR のリン酸化抑制機構を明らかにすることは、癌の治療法開発に新たな展開が期待できる。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Regulatory mechanisms for malignant properties by blood group antigen Lewis y in oral squamous cell carcinomas

○Hamamura K, Togari A

Div Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Purpose: Recently, we identified blood group antigen Lewis y as specific glycosylation expressed in oral squamous cell carcinomas (SCC). In normal squamous epithelia, the expression of Lewis y is not observed. But in oral SCC, high expression levels of Lewis y are detected. In this study, we analyzed involvement of Lewis y in regulation of malignant properties in oral SCC. **Material & Methods:** Immunoblotting was performed with anti-Lewis y and anti-EGFR antibodies as well as an anti-phosphotyrosine antibody (PY20). The phosphorylated levels of EGFR after EGF stimulation were analyzed using Lewis y + transfectant cells which was established by transfecting Lewis y negative cells with fucosyltransferase (fut1) cDNA. **Results & Conclusion:** EGFR was identified as a representative Lewis y-carrying molecule. In 7 oral SCC cell lines, inverse correlations between phosphorylated levels of EGFR and expression levels of Lewis y on EGFR were detected. Furthermore, phosphorylated levels of EGFR after EGF stimulation were weaker in Lewis y + transfectant cells than in the controls. The cell growth and invasion activity of the transfectant cells were suppressed compared to the controls. Correctively, this study suggests Lewis y might be involved in negative regulation of phosphorylation of EGFR in oral SCC.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D9 口腔扁平上皮癌細胞由来エクソソームによる細胞間クロストークと病態形成

○森岡 政彦^{1,2}, 川久保-安河内 友世², 中村 誠司¹

¹九大 院歯 顎顔面腫瘍制御

²福岡大 薬 免疫・分子治療

癌の浸潤・転移に対する評価は、腫瘍の進展を的確に把握するために必須であり、より精度の高い浸潤・転移評価法の開発が望まれている。近年、癌細胞が分泌するエクソソーム(細胞外小胞体の一種)が、癌における微小環境の構築に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで本研究では、同一患者由来の転移能の異なるヒト口腔扁平上皮癌細胞株2種(非転移株 SQUU-A/高転移株 SQUU-B)を用い、エクソソームが規定する癌の病態形成機構について解析を行った。マトリゲル浸潤アッセイの結果、SQUU-B由来のエクソソーム(exoB)中に浸潤能を規定する成分が存在すること、また、その浸潤能はエクソソームを介して非転移株 SQUU-Aに移行することが明らかとなった。続いて、SQUU-A由来エクソソーム(exoA)およびexoBが腫瘍進展に必須となる管腔形成に及ぼす影響について調べるため、HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)あるいはHDLEC(ヒトリンパ管内皮細胞)を用いてVEGF-VEGFR関連遺伝子の発現解析を行った。その結果、exoA/exoBを作用させたHUVECではVEGF-VEGFR関連遺伝子の変動がほとんど認められなかったのに対し、HDLECではVEGFR1, VEGFR2, VEGFR3の有意な発現上昇を認め、VEGF-A, VEGF-C, VEGF-DはexoBでのみ発現が亢進した。また、管腔形成実験においても、特にexoBがHDLECに管腔形成能を亢進させている様子が観察された。これらの結果は、単一癌巣内のそれぞれの癌細胞が各々の個性をもつエクソソームを分泌しており、それらを介した複雑な細胞間クロストークによって浸潤・転移性が規定され、この複雑な環境が予後を規定していることを示唆している。【会員外共同研究者：樋川舞, 西中川拓也, 小野和彦, 中島学(福岡大薬)】
【利益相反】利益相反状態にはありません。

Intercellular crosstalk defined by exosomes from oral squamous carcinoma cells determines its pathological process

○Morioka M^{1,2}, Kawakubo-Yasukochi T², Nakamura S¹

¹Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Dept Immun Mol, Fukuoka Univ Fac Pharm Sci

Cancer cell-derived exosomes have recently emerged as critical in cell-to-cell and cell-to-matrix communication. In this study, we examined the effect of exosomes from oral squamous carcinoma cells on cancer invasive and metastatic process, using SQUU-A (nonmetastatic) and SQUU-B (highly-metastatic) cells which were originated in the same patient. Matrigel invasion assay revealed that the exosome derived from SQUU-B (exoB) spread its metastatic potential to SQUU-A. We further evaluated the effect of exosome derived from SQUU-A (exoA) and exoB on angiogenesis and lymphangiogenesis using HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) and HDLECs (human dermal lymphatic endothelial cells). As a result, HUVECs exposed to exoA or exoB had little change in the expression levels of VEGFs and VEGFRs, which are closely related with tube formation. In contrast, the expression levels of VEGFR1, VEGFR2 and VEGFR3 in HDLECs were significantly increased by exoA and exoB, and those of VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D were increased only by exoB. Additionally, these results were reflected to structure-forming ability in tube formation assay. Our data indicate that the cancer cell-derived exosome undertakes crosstalk with different malignant cell clones in an identical tumor microenvironment and luminal cells closely related to cancer dissemination, and which may define clinical prognosis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D10 浸潤先端部における Galectin-1 の過剰発現は口腔歯肉扁平上皮癌の転移に関与する

○野田 百合, 佐藤 淳, 廣瀬 勝俊, 社領 美紀, 豊澤 悟

阪大 院歯 口腔病理

【目的】 Galectin-1 (Gal1) は beta-galactoside に結合する動物レクチンである。腫瘍化に伴う Gal1 発現の増加や、Gal1 高発現に伴う腫瘍の予後の悪化が報告されている。腫瘍の浸潤先端部には、浸潤突起 (invadopodia) という浸潤性癌細胞が有する細胞膜構造が存在し、浸潤突起には膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT1-MMP) が集積して腫瘍の転移に関与する。また、浸潤先端部には上皮間葉転換 (EMT) が起こることが知られている。我々は、Gal1 が口腔の扁平上皮癌の浸潤先端部で高発現することに着目し、Gal1 発現と上記因子の MT1-MMP と EMT が転移に及ぼす影響を検証した。【材料・方法】大阪大学歯学部附属病院で採取された扁平上皮癌組織標本に対して抗 Gal1 と抗 Vimentin (Vim) 抗体を用いて二重免疫染色を施行した。口腔由来培養細胞株 HSC-3 を用いて wound healing assay を行い、伸展部の先端における EMT を検証した。また、三次元細胞培養を行い、抗 Gal1, 抗 E-cadherin, 抗 Vim, 抗 MT1-MMP 抗体を用いて免疫蛍光染色を施行した。また、Phalloidin 染色で細胞骨格を確認した。【結果】組織における Gal1 は Vim の発現と相関していた ($P < 0.01$)。特に浸潤先端部で両蛋白の発現が認められ、両蛋白の発現は、転移と MT1-MMP の発現に相関していた ($P < 0.01$)。成長因培養細胞を用いた実験では、スクラッチ部に伸展した細胞やゲル内に浸潤した細胞に EMT が確認された。特に伸展・浸潤部の先端部の細胞では細胞骨格の発達が認められ、同細胞では MT1-MMP1 の発現の増加していた。【結論】腫瘍組織において、Gal1 は EMT の発現や浸潤突起の形成に関与することで、腫瘍細胞の転移を促進させている可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The relationship between Galectin-1 expression at the tumor invasion front and tumor metastasis of oral gingival squamous cell carcinoma

○Noda Y, Satou S, Hirose K, Sharyo M, Toyosawa S

Dept Oral Pathol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Galectin-1 (Gal1) is the beta-galactoside-binding lectin and overexpresses at the tumor invasion front (TIF). It is reported that Gal1 is an inducer of EMT and its expression in cancer is positively associated poor prognosis. However, the role of Gal1 at the tumor invasion front (TIF) is uncertain. In this study, we analyzed the relationship between Gal1 expression at the TIF and tumor metastasis, especially focused cancer EMT and invadopodia, which are ECM-degrading membrane protrusion of invasive cells. Eighty specimens of gingival squamous cell carcinoma (GSCC) were stained by dual immunohistochemistry using the anti-Gal1 and the anti-Vimentin. To evaluate the cancer cell EMT, we used the wound healing assay and three-dimensional (3D) collagen gel culture with Human oral SCC cells (HSC-3) which expresses Gal1. We performed immunofluorescence using anti-Vimentin and anti-E-cadherin which are EMT makers, Anti-MT1-MMP and Alexa-594-conjugated phalloidin for detecting the invadopodia. Gal1 expression at the ITF of GSCC correlated with lymph node metastasis ($P < 0.001$) and cancer cell EMT ($P < 0.001$). EMT was occurred at the edge of the wounding and invading cells in the 3D gel. Invadopodia was found the EMT cells. Gal1 may contribute to the metastasis of GSCC by promoting the EMT process and invadopodia formation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D11 酪酸刺激誘導 NETosis 様細胞死による DAMPs 及びリウマチ関連因子の放出

○津田 啓方, 室伏 貴久, 山口 洋子, 鈴木 直人

日大 歯 生化

成熟プラークが接する歯肉溝上皮では、上皮細胞がプラーク細菌と歯肉溝浸出液由来の栄養を競合し合っていると考えられる。また、成熟プラーク中の一部の嫌気性細菌は高濃度の酪酸を産生する。我々は成熟プラークが歯肉上皮に接している環境を想定し、歯肉上皮株化 Ca9-22 細胞に低血清条件下で酪酸を作用させるとオートファジー依存的な細胞死を引き起こす事を以前報告した (Tsuda, JPR 2010)。この細胞死が歯周組織に及ぼしうる影響調べる為に、細胞死により培養上清中に放出される分子を調べたところ、DNA、ヒストン、および HMGB1 などの Damage-associated molecular patterns (DAMPs) が含まれていた。これらの上清中への放出は、低血清条件においても継時的に誘導されるが、酪酸の作用が加わるとさらに多くの DAMPs が放出された。次に低血清条件下で酪酸を作用させたカルチャー中の DNA を蛍光染色し、顕微鏡で観察したところ、細胞外に糸状の DNA が確認できた。このことから、この細胞死は好中球で見られる NETosis と同様の細胞死の可能性が考えられた。NETosis はオートファジーおよび活性酸素種依存的であるため、atg5 siRNA によるオートファジーの抑制、N-acetylcysteine による活性酸素種のスキャベンジを行うと、低血清条件下における酪酸誘導細胞死は抑制された。これらのことから、この細胞死は NETosis 様の細胞死であり、それにより DAMPs が放出され、その結果歯周組織に炎症を引き起こしている可能性が示唆された。さらに、培養上清中に放出されている分子には関節リウマチの発症との関連が言われている分子が含まれており、本研究が歯周疾患と関節リウマチの関係を解き明かすきっかけになる可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Induction of NETosis-like cell death of gingival epithelial cells by butyrate stimulation promotes release of inflammation-related molecules

○Tsuda H, Murofushi T, Yamaguchi Y, Suzuki N

Dept Biochem, Nihon Univ Sch Dent

Purpose of this study: Gingival epithelial cells facing mature dental plaque suffers from nutrient shortage and butyrate stimulation introduced by butyrate-producing periodontal bacteria. In this study, we determined the effects of starvation and butyrate exposure on gingival epithelial cell death and subsequent release of molecules relate to inflammation. **Materials and Methods:** A gingival epithelial Ca9-22 cell line was used. SYTOX-Green dye was used for measuring dead cells. Release of DNA into the culture supernatant was measured using the SYTOX-Green dye. Amount of molecules released into culture supernatant were determined by Western blot. **Results and Conclusion:** Butyrate stimulation in the starved condition induced cell death. In addition, it accompanied release of DNA, which is often shown in neutrophil extracellular traps (NETs). Furthermore, since the cell death was dependent of autophagy and reactive oxygen species induced by butyrate stimulation, it is suggested that the cell death may be NETosis, a type of cell death accompanying NETs. During the cell death, some inflammation related molecules were released in the culture supernatant. These findings suggest that butyrate stimulation in the serum-starved condition induces NETosis-like cell death and subsequent release of molecules relate to inflammation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D12 cadherin/catenin シグナルを介した MMP-20 のエナメル質形成制御機構

○進 正史¹, 岡本富士雄¹, 鍛冶屋 浩¹, 緒方佳代子¹, 岡部 幸司¹

¹福歯大 細胞生理

²オハイオ州立大 歯 生物科学

【目的】 Matrix Metalloproteinase-20 (MMP20: enamelysin) は分泌期のエナメル芽細胞に高発現する。ヒト MMP20 遺伝子 (MMP20) の変異はエナメル質形成不全症を引き起こし, Mmp20 欠損マウスはエナメル質タンパクの分解不正やエナメル質層の剥離が認められる。我々は MMP20 が細胞間接着分子である cadherin を分解することを明らかにしており, さらに MMP20 と cadherin/catenin シグナルとの関連を MMP20 過剰発現の実験系を用いて検討した。【方法と結果】 まず, エナメル芽細胞由来細胞株に Mmp20 を過剰発現させた細胞株を樹立し, *in vitro* 解析を行った。この細胞株では細胞浸潤が亢進しており, 細胞間接着が失われると共に cadherin/catenin 複合体を形成する β -catenin の核内集積が認められた。Mmp20 遺伝子をエナメル芽細胞に特異的な遺伝子である Amelogenin プロモーターの下流に組換えたトランスジェニックマウス (Mmp20Tg) を作製し, MMP20 の *in vivo* 解析を行った。その結果, Mmp20 欠損マウスへの transgene 発現は, そのエナメル質形成不全を改善させた。一方, 正常な野生型マウスへの過剰発現では意外なことにエナメル質形成の著しい低下が認められた。この Mmp20Tg マウスの切歯では薄いエナメル質様の構造がエナメル質外層と象牙質上に発現し, その中間に細胞層の浸潤やコラーゲンを含む骨様石灰化物が認められた。また, 野生型マウスのエナメル芽細胞では β -catenin は細胞膜上に発現したが, Mmp20Tg マウスでは β -catenin は核内に強い発現が認められた。【結論】 MMP20 の過剰発現は cadherin 分解や β -catenin 核内移行を介して, エナメル芽細胞等の組織浸潤を促進し, エナメル質形成不全を呈すると考えられた。従って, MMP20 欠損でのエナメル質形成不全と合わせて, MMP-20 の至適発現量が cadherin/catenin シグナルとエナメル質形成機構の連携に重要であることが示唆された。【共同研究者】 オハイオ州立大学 John Bartlett
【利益相反】 利益相反状態にはありません。

MMP-20 regulates enamel development via cadherin/catenin signaling

○Shin M¹, Okamoto F¹, Kajiya H¹, Ogata K¹, Okabe K¹

¹Div Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll

²Div Biosci, Ohio State Univ

Purpose: Matrix Metalloproteinase-20 (MMP20) is expressed in teeth. Mutations in MMP20 cause amelogenesis imperfecta and Mmp20 ablated mice have hypoplastic enamel. We sought to determine how Mmp20 over-expression results in enamel malformation. **Materials & Methods:** Mmp20Tg mice were characterized by western blots, histological analyses and qPCR. **Results & Conclusion:** Transgenic mice that use the amelogenin promoter to drive Mmp20 expression (Mmp20Tg) in the Mmp20 ablated background, significantly improved the physical properties of their enamel. When the transgene was present in the wild-type (WT) background, the enamel became malformed. Incisors from Mmp20+/+ mice expressing the Mmp20Tg had a massive cell infiltrate which occupied a large area within the enamel space. A thin layer of enamel-like material remained over the dentin and at the outer enamel surface, but between these regions were numerous cells and ectopic bone-like calcifications. Instead of predominantly locating adjacent to the ameloblast cell membrane, β -catenin was predominantly present within the nuclei of the invading cells. MMP20 overexpression increased cadherin cleavage and β -catenin release from cadherin complexes. The released β -catenin appeared to translocate to ameloblast nuclei, which promoted cell migration/invasion. Therefore, we conclude that MMP20 overexpression promotes a massive cell migration into the forming enamel layer through cadherin/catenin signaling.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D13 Semaphorin 4D-RhoA-Akt シグナルはエナメル芽細胞分化において amelogenin 分泌と細胞極性を協調的に制御する

○大津 圭史¹, 依田 浩子², 藤原 尚樹¹, 原田 英光¹

¹岩医大 歯 発生生物

²新潟大 院医歯 硬組織形態

エナメル芽細胞は分化の過程で、極性を持った丈の高い円柱形の細胞に変化し、遠位端側へエナメル基質タンパクを分泌するようになる。本研究ではこの形態と機能の変化を統合的に制御するシグナル分子メカニズムを明らかにした。マウス切歯を用いた免疫染色により、神経軸索の伸張を司るガイダンス因子 Semaphorin 4D (Sema4D)とそのレセプター Plexin B1, 活性型 RhoA, リン酸化 Akt (p-Akt)の発現はエナメル芽細胞の分化とも増加し、近位端に局在していくことがわかった。また、Sema4D リコンビナントタンパクの添加は初代培養エナメル芽細胞に対して RhoA の活性化, アクチン重合, amelogenin の発現を促進させた。一方、マウスの切歯の器官培養に Sema4D の中和抗体を作用させるとエナメル芽細胞の極性が失われ、amelogenin の発現パターンが変化した。さらに培養エナメル上皮細胞における Plexin B1 のノックダウンは amelogenin と p-Akt の発現, アクチン重合を抑制した。さらにエナメル上皮細胞特異特異的にドミナントネガティブ RhoA が発現する遺伝子改変マウスを作製したところ、エナメル芽細胞分化に伴う極性・形態変化と amelogenin, p-Akt の発現が抑制されていた。また、Akt inhibitor はマウス臼歯器官培養においてエナメル芽細胞の極性・形態変化と amelogenin の発現を阻害した。以上の結果より、Sema4D-RhoA-Akt シグナルはエナメル芽細胞分化において、amelogenin 分泌と細胞極性を協調的に制御することが明らかとなった。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The Semaphorin 4D-RhoA-Akt signal regulates amelogenin secretion in coordination with cell polarity during ameloblast differentiation

○Otsu K¹, Ida-Yonemochi H², Fujiwara N¹, Harada H¹

¹Div Dev Bio Reg Med, Iwate Med Univ Sch Dent

²Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

During tooth development, ameloblasts directionally secrete enamel matrix proteins and morphologically change from low columnar cells to polarized tall columnar cells. In this study, we explored the molecular mechanism that integrates the ameloblast morphology and function. Immunohistochemistry of mouse incisors revealed that the expression of Semaphorin 4D (Sema4D), which originally identified as axon guidance factors, its receptor Plexin B1, active RhoA and phosphorylated Akt (p-Akt) accumulated at the proximal ends of differentiated secretory ameloblasts. Sema4D recombinant protein increased activity of RhoA, actin polymerization and amelogenin expression in cultured primary ameloblasts. On the other hands, neutralized antibody of Sema4D resulted in morphologic degeneration and reduction of amelogenin expression of secretory ameloblasts. A knock down of PlexinB1 also inhibited actin polymerization and amelogenin and p-Akt expression. Furthermore, transgenic (TG) mice with ameloblasts-specific expression of RhoA dominant-negative form demonstrated that the expression of amelogenin and p-Akt and polarization in ameloblasts were hindered. Moreover, Akt inhibitor hindered the polarity and amelogenin expression of ameloblasts in organ-cultured mouse molars. Together, these results demonstrated that Sema4D-RhoA-Akt signaling coordinate amelogenin secretion and cell polarized morphology in ameloblast differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D14 歯のエナメル上皮における RUNX1 と CFBF は、マウスのエナメル質形成のために重要です

○Sarper Safiye¹, 三浦 治郎², 山口 哲³, 今里 聡³, 森田 知里¹, 山城 隆¹

¹阪大 院歯 矯正

²阪大 院歯 総診

³阪大 院歯 歯科理工

Runx1 and Cbfb in dental enamel epithelium is important for enamel formation in mouse

○Sarper S¹, Miura J², Yamaguchi S³, Imasato S³, Morita C¹, Yamashiro T¹

¹Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Div Interdisci Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent

³Dept Biomater Sci, Osaka Univ Grad Sch Dent

Enamel is one of the main tissue for making up the tooth and has the hardest combination in human body. Many genes are involved in enamel formation. If enamel formation altered human disease named enamel hypoplasia may occur. We have already discovered that epithelial elimination of one of transcription factor *Cbfb* which is one of the co-factor of *Runx* gene family result in enamel hypoplasia in mice incisor. It has been known that *Runx1* and *Cbfb* expression was observed only at dental epithelium. In this study we focused on the role of *Runx1* and *Cbfb* on molar enamel formation. We hypothesize that *Runx1* and *Cbfb* deficiency in dental epithelium results in enamel hypoplasia of mouse molar. **Purpose:** In order to investigate how *Runx1* and *Cbfb* in the dental epithelium effects enamel formation and ameloblast differentiation. **Materials & Methods:** We generated epithelial specific knock out mouse using Cre-loxp (K14 Cre *Runx1*^{fl/fl} and K14 Cre *Cbfb*^{fl/fl}) system. We used micro-CT to see morphological defect. Mineralized tissue was examined through Scanning electron microscope and Vickers hardness test. In order to reveal histological defect of K14 Cre *Runx1*^{fl/fl} (*Runx1* cKo) and K14 Cre *Cbfb*^{fl/fl} (*Cbfb* cKo) mice we performed hematoxylin-eosin staining on sections from dissected maxilla and mandibule. For observing detailed enamel prism structure, electron micrographs was used to analyze from the surface of epoxy resin embedded tooth of adult mice. We used laser microdissection system to disclose genes that have interaction with *Runx1*-*Cbfb* system. **Results & Conclusion:** From gross morphological analysis of incisor teeth we revealed abrasion at cusps of *Runx1* cKo and *Cbfb* cKo mouse molars. Electron micrographs also showed that increased abrasion on occlusal surface of molars and increased organic material in *Runx1* cKo and *Cbfb* cKo mice than control mice. Additionally enamel prism structure is obviously disturbed in *Runx1* cKo as well as *Cbfb* cKo mice. Moreover histological analysis uncovered that *Runx1* cKo and *Cbfb* cKo mice have retarded enamel formation and marked defect of ameloblast differentiation. As the result of PCR of laser microdissected tissue, we reveal that expression of enamel specific genes significantly decreased at dental epithelium of cKo molar. Taken together *Runx1* and *Cbfb* in dental epithelium is critical for ameloblast differentiation and enamel formation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D15 エナメルとガノインの分子生物学的解析

○石山巳喜夫¹, 三上 正人², 中富 満城³, 岡 俊哉⁴, 佐藤 秋絵⁵, 田畑 純⁶, 笹川 一郎⁷

¹日歯大新潟 解剖 2

²日歯大新潟 微生物

³九歯大 解剖

⁴日歯大新潟 生物

⁵鶴大 歯 解剖 II

⁶医科歯科大 院医歯 硬組織構造

⁷日歯大新潟 先端研セ

【はじめに】脊椎動物の上皮性硬組織とくにエナメルとガノインの系統発生的連続性を明らかにする目的で、肉鰭類のシーラカンス、ハイギョ (Lepidosiren) および条鰭類のガーパイク (Lepisosteus oculatus) の歯と鱗の発生過程におけるエナメル関連遺伝子の存在と発現を RT-PCR 法により調べた。【材料と方法】ガーパイクとハイギョは生体を観賞魚店より購入し、シーラカンスは東工大・タンザニア政府による国際プロジェクトで採集された成体と胎仔の一部組織を使用した。ハイギョとガーパイクを冷水麻酔の後、歯列と鱗を摘出し、total RNA を抽出して、逆転写反応により cDNA を合成した後、これをテンプレートにして PCR を行ない、四足動物の遺伝子との ortholog の存在を探求した。【結果および考察】解析の結果、ハイギョで amelogenin と ameloblastin、シーラカンスで amelogenin, ameloblastin, enamelin および amelotin が見つかるとともに、肉鰭類はいずれも amelogenin を持っていることが証明された。一方、条鰭類のガーパイクにおいては ameloblastin と enamelin は存在するものの、エナメルの主要蛋白である amelogenin は欠如していた。本種は鱗にガノイン層、歯にカラーエナメルを持っているので、amelogenin に代わる類似蛋白が必要であると考えられる。現在、このような遺伝子が実際に存在するかどうか検討中である。少なくとも、エナメルとガノインは同じ上皮性硬組織であり微細構造も酷似するが、主要蛋白の種類が異なっている可能性が高く、「同じ組織」とは言えないように思われる。同時に、ガーパイクの歯にみられるカラーエナメルもエナメルの範疇ではなくガノインに区分される組織であると推察される。なお、本研究はペンシルバニア州立大学 川崎和彦博士との共同研究である。【利益相反】利益相反状態にはありません。

Molecular biological analyses of tooth enamel and scale ganoine in certain primitive fishes

○Ishiyama M¹, Mikami M², Nakatomi M³, Oka S⁴, Sato A⁵, Tabata M⁶, Sasagawa I⁷

¹Dept Histol, Nippon Dent Univ at Niigata

²Dept Microbiol, Nippon Dent Univ at Niigata

³Div Anat, Kyushu Dent Univ

⁴Dept Biol, Nippon Dent Univ at Niigata

⁵Dept Anat Histocytol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

⁶Div Biostructural Sci, Tokyo Med Dent Univ Gard Sch Med Dent Sci

⁷Adv Res Cent, Nippon Dent Univ at Niigata

In order to understand the phylogenetic relationship between tooth enamel found in Sarcopterygii and scale ganoine in Actinopterygii, the enamel genes were sought by RT-PCR. We searched for cDNA libraries we made from tooth germs of Latimeria (coelacanth), Lepidosiren (lungfish), and Lepisosteus (gar-pike) and from scales of Latimeria and Lepisosteus. The result showed expression of the amelogenin, enamelin, and ameloblastin genes in both tooth germs and scales in Latimeria, and the amelogenin and ameloblastin genes in the tooth germs of Lepidosiren. Furthermore, we detected expression of ameloblastin and enamelin in the tooth germs and scales of Lepisosteus but not of amelogenin in either of these tissues. Thus, amelogenin was identified in the two representatives of basal living Sarcopterygii but not in Actinopterygii. Previous immunohistochemical analyses have demonstrated that the scale ganoine matrix and mammalian amelogenin share epitopes, suggesting that ganoine is identical to tooth enamel. The present study, however, reveals that scale ganoine consists of essential proteins different from those of tooth enamel. We consider that this represents a significant divergence of these two tissues. This is a collaborative work with Dr. Kazuhiko Kawasaki (Penn State).

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D16 マウス切歯の形態形成における非筋ミオシン II の役割

○山中 淳之¹, Hu Jimmy², 後藤 哲哉¹, Klein Ophir²

¹鹿大 院医歯 機能形態

²Program in Craniofac Biol, Univ California, SF

【目的】ミオシン II は、軽鎖がリン酸化されると重合し双極性のフィラメントを形成して、アクチン細胞骨格を収縮させる。非筋細胞におけるミオシン II は、必要な時に局所的に重合し、細胞内部からの収縮力を発揮する。歯胚上皮の形態がダイナミックに変化する歯の形態形成の過程では、上皮細胞内部の張力が正常な形態形成にとって重要な働きをもっていると考えられる。本研究の目的は、歯の形態形成過程における非筋ミオシン II の役割を明らかにすることである。

【方法】まず、マウス下顎切歯の蕾状期から帽状期（胎生 12.5~14.5 日齢 (E12.5~E14.5)）の歯胚におけるミオシン II の局在を蛍光免疫染色により検出した。次に、E12.5 のマウスの下顎を切り出し、マトリゲル上で 3 日間器官培養を行った。培地にミオシン II の阻害剤 Blebbistatin を添加し、切歯の形態形成の変化を観察した。また、上皮特異的なミオシン II の働きを調べるために、K14 発現細胞でミオシン II 重鎖をコードする遺伝子 *Myh9* と *Myh10* を欠損させるコンディショナルノックアウトマウスを使って切歯の形態形成の異常を観察した。

【結果と考察】ミオシン II は、歯胚上皮の基底層と基底上層の境界部、および基底上層の唇側（前方）で強い局在が見られた。ミオシン II の機能を阻害した培養歯胚、および K14 発現細胞でミオシン II 遺伝子を欠損させた歯胚では、蕾状期から帽状期への移行期において、歯胚上皮の間葉への陥入が十分に起こらなかった。また、基底層と基底上層の組織化が乱され、歯胚上皮の正常な形態形成が行われなかった。一方で、エナメル結節の形成は完全には阻害されなかった。以上のことから、ミオシン II は、歯胚上皮細胞の局所的な張力を介して、歯胚上皮の陥入およびその後の形態形成を制御するが、エナメル結節の形成は、主にミオシン II 非依存的なメカニズムにより制御されていることが明らかになった。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The role of non-muscle myosin II during mouse incisor morphogenesis

○Yamanaka A¹, Hu J², Goto T¹, Klein O²

¹Dept Anat Oral Sci, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Program in Craniofac Biol, Univ California, SF

Myosin II is an actin-binding motor protein, which is present in all non-muscle cells and contracts along actin cytoskeletons to generate cellular tension. During tooth development, dental epithelium changes its shape dynamically, suggesting that cellular forces could play important roles for the normal morphogenesis. The goal of this study is to elucidate the function of non-muscle myosin II during early tooth morphogenesis.

First, we examined the localization of myosin II in the mouse lower incisor germ. Next, we conducted explant culture experiments, where mouse mandibles were treated with myosin II inhibitor Blebbistatin. Finally, we took a genetic approach using mice with myosin II conditionally deleted in K14-expressing epithelial cells.

We found that myosin II was highly localized at the interface between suprabasal and basal cells, and in the anterior aspect of suprabasal layer. In the explants cultured with Blebbistatin, and in the myosin II-deficient mice, dental epithelium at bud stage failed to invaginate sufficiently. Additionally, loss of myosin II activity disrupted organization of epithelial cells, but did not fully disturb enamel knot formation. These results indicate that cellular tension generated by myosin II controls dental epithelial invagination and later morphogenesis, but enamel knot formation is largely independent of myosin II activity.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D17 上皮-間葉転換を起こしたヘルトヴィッヒ上皮鞘は、歯根膜を構成する細胞外基質を産生する

○岡 暁子¹, 板家 智¹, 緒方佳代子¹, 戸田 雅子¹, 藤原 尚樹², 大津 圭史²,
立岡 迪子¹, 尾崎 正雄¹, 原田 英光²

¹福歯大 成長発達 小児歯

²岩医大 歯 発生生物

【背景】我々は、ヘルトヴィッヒ上皮鞘細胞株 HERS01a は、TGF- β 刺激によって上皮間葉転換 (EMT) が惹起されることを示してきた。今回、EMT により間葉系の細胞となった HERS01a 細胞の歯根膜形成への関与について解析した。**【方法】**細胞は、マウス HERS 細胞株 HERS01a 細胞を用いた。培地に 10 ng/ml の TGF- β 1 を添加し EMT を誘導後、48 時間および 96 時間培養し細胞を回収し RNA を抽出した。また、TGF- β 中和抗体 (SB431542) を添加し、TGF- β シグナルの抑制効果も検討した。Real Time-PCR, Western blot にて歯根膜を構成する細胞外基質蛋白 Type I collagen, Fibronectin, Periostin および骨芽細胞マーカー Runx2, Osterix, の発現を調べた。また、HERS01a 細胞を PGA コーティングしたカバーガラス上で培養し、TGF- β 1 刺激後、Type I collagen, Fibronectin, Periostin とサイトケラチンの発現を蛍光免疫染色にて観察した。**【結果】**Type I collagen, Fibronectin, Periostin の発現は TGF- β 1 添加によって誘導され、TGF- β 中和抗体存在下で抑制された。Runx2, Osterix は、TGF- β 1 添加でもその発現は誘導されなかった。細胞免疫染色では、サイトケラチン抗体に陰性である細胞とその周囲に Type I collagen, Fibronectin, Periostin の発現が観察された。**【結論】**ヘルトヴィッヒ上皮鞘由来の歯原性上皮細胞は、TGF- β 1 によって刺激すると間葉系細胞の性質を示すようになり、歯根膜を構成する細胞外基質蛋白を発現するようになることが明らかとなった。この現象は、ヘルトヴィッヒ上皮鞘やマラッセの上皮遺残の細胞が歯根膜形成に関与していることを示唆している。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Hertwig's epithelial sheath cells join the extracellular matrix expression in periodontal ligament

○Oka K¹, Itaya S¹, Ogata K¹, Toda M¹, Fujiwara N², Ohtsu K², Tatsuoka M¹, Ozaki M¹,
Harada H²

¹Div Pediatr Dent, Fukuoka Dent Coll

²Div Dev Bio Reg Med, Iwate Med Univ Sch Dent

Background: In our previous study, Hertwig's epithelial root sheath (HERS) cells were expressed mesenchymal cell markers after epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TGF- β 1. This study was investigated the role of HERS cells after EMT in periodontal ligament (PDL). **Methods:** Established mouse HERS cells (HERS01a) were used. After pre-culture, they were stimulated with/without 10 ng/ml TGF- β 1 and/or ALK5 inhibitor (SB431542) for 48 and 96 hours. Real time PCR and Western blot were performed to examine the expression of Type I collagen, Fibronectin and Periostin. Osteogenic marker, Runx2 and Osterix were also examined. Immunofluorescent staining of Type I collagen, Fibronectin, Periostin were examined with Cytokeratin14. **Results:** HERS01a cells were expressed Type I collagen, Fibronectin and Periostin by TGF- β 1 stimulation, and these responses were inhibited in cultured with SB431542. However, Runx2 and Osterix expressions in HERS01a were not induced by TGF- β 1. Type I collagen, Fibronectin and Periostin were expressed in HERS01a cells after EMT which were not expressed with Cytokeratin14. **Conclusion:** These results indicate that HERS cells induce the PDL related ECM after EMT by TGF- β 1 stimulation. It might be one of the important roles of HERS and epithelial cell rests of Malassez for the PDL formation and maintenance.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D18 マウス歯髄細胞/組織および骨芽細胞/組織における Meis2 発現

○川島 伸之¹, 齋藤 正寛², 興地 隆史¹

¹医科歯科大 院医歯 歯髄生物

²東北大 院歯 歯科保存

【緒言】 TALE (three amino acid loop extension) ホメオドメイン転写調節因子の一つである Meis (myeloid exotropic viral integration site) 2 は, Hox 転写因子の機能調節を行っているが, 近年神経堤細胞の分化に深く関与していることが明らかになった. しかし, 歯髄細胞, 骨芽細胞および歯髄, 骨組織における Meis2 の発現および機能については十分な解析はされていない. 今回, マウス株化歯髄細胞, マウス株化骨芽細胞, マウス切歯歯髄組織, 頭蓋骨組織における Meis2 の発現動態について検討した. **【材料および方法】** マウス株化歯髄細胞 (MDP) およびマウス株化骨芽細胞 (C3H10T1/2, MC3T3-E1) より抽出した Total RNA より cDNA を作成し, real-time PCR を行った. マウス (C57BL6, オス 6 週齢, n=2) 切歯より摘出した歯髄組織あるいは大腿骨組織よりタンパクを抽出し, 抗 Meis2 抗体を用いて Western Blot を行った. **【結果および考察】** Meis ファミリーには 1 から 3 までであるが, MDP, C3H10T1/2, MC3T3-E1 においては, Meis2 の発現が最も高く, 次に Meis1, Meis3 の順であった. また, マウス Meis2 には 1-6 まで 6 つのトランスクリプトバリエントが存在する. MDP, C3H10T1/2, MC3T3-E1 における Meis2 のトランスクリプトバリエントは 1 および 4 型であった. さらに, マウス歯髄組織および頭蓋骨組織より得られたタンパクにおいて Meis2 の発現を認めた. マウス成体において Meis2 は歯髄組織および骨組織に発現していることが明らかになった. (研究協力: 野田園子, 橋本健太郎)

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Expression of Meis2 in mouse dental pulp cells/tissue and osteoblasts/bone

○Kawashima N¹, Saito M², Okiji T¹

¹Dept Pulp Biol Endod, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Div Oper Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Introduction: Meis (myeloid exotropic viral integration site) 2, which belongs to the TALE (three amino acid loop extension) homeodomain transcriptional factors, regulates the transcription of the Hox gene. Recently, Meis2 is reported to be involved in the differentiation of neural crest cells. This study aimed to analyze the expression of Meis2 in mouse dental pulp cells/tissue and osteoblasts/bone. **Materials and Methods:** Total RNA from clonal mouse dental papillae cells (MDPs) and clonal mouse osteoblasts (C3H10T1/2, MC3T3-E1) was converted to cDNA. Expression of Meis2 was analyzed by real-time PCR using specific primers. Lysates of dental pulp tissues and femur from mice (C57BL6, male, 6w old, n=2) were analyzed with Western Blot using anti-Meis2 antibody. **Results and Discussion:** The Meis family is comprised of Meis1 to 3, and expression levels in MDP, C3H10T1/2 and MC3T3-E1 were in the order of Meis2 > Meis1 > Meis3. There are six transcript variants in the Meis2 RNA, and the expression of variant #1 and #4 was detected in these cells. High expression of Meis2 protein was detected in mouse dental pulp tissue and femur. We conclude that Meis2 is expressed in dental pulp and bone of adult mice. (collaborators: Noda S, Hashimoto K)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D19 急性期ラット脊髄圧挫損傷モデルに対する歯髄細胞移植による後肢運動機能回復への効果

○大谷 憲司^{1,2}, 佐久間重光³, 本田 雅規²

¹株式会社再生医療推進機構

²愛院大 歯 口腔解剖

³愛院大 歯 冠・橋義歯

【目的】脊髄損傷に対する間葉系幹細胞移植の有効性が報告されているが、その動物実験における評価は完全切断モデルが主に行われている。そこで、本研究では歯髄細胞移植の有効性について、臨床における脊髄損傷に類似した脊髄圧挫損傷モデルを用いて検討した。さらに、適切な細胞の投与時期については、明らかになっていないことから、本研究では、急性期を想定し圧挫直後に細胞を投与した場合の適切な投与部位について検討したので報告する。【方法】脊髄の圧挫損傷は椎弓を切除した第9胸髄に、脊髄圧挫損傷装置 (IH-O400 impactor : PSI) を用いて 200kDynes の圧力を加えて脊髄を挫滅させた。細胞はラット上顎切歯より歯髄組織を採取後、酵素処理にて単離し、培養増殖させた。必要な細胞数を確保後に、細胞数 6×10^5 cells に調製した細胞懸濁液をラット脊髄圧挫損傷直後に細胞の投与部位として次の3群を設定し、後肢の運動機能を評価することとした。第一群：圧挫損傷部に直接移植する、第二群：圧挫損傷部より5mm吻側へ2か所に細胞を移植する、第三群：損傷部より5mm尾側へ2か所に細胞を移植する。対照群は細胞懸濁液に用いたPBSを圧挫損傷部に注入した。施術直後から後肢運動機能評価法 (BBB スコアリングシステム) を用いて、毎週下肢の運動機能を術後42日まで観察した。組織学的評価として Hematoxylin-Eosin 染色法, Luxol Fast Blue 染色法, 免疫組織化学染色法を用いて評価を行った。【結果】圧挫損傷部および吻側へ細胞を移植した群では、対照群と比較して後肢の運動機能が有意に改善した。一方で、尾側へ細胞移植を行った群は対照群と同程度の結果となった。現在、免疫組織化学的に解析中である。【結論】圧挫損傷直後の急性期への細胞投与においても有意に後肢運動機能が回復することが明らかとなった。

【利益相反】利益相反状態にあります。

Transplantation of dental pulp cells for acute spinal cord injury in a rat model

○Otani K^{1,2}, Sakuma S³, Honda M²

¹Adv Center for Tissue Engineering Ltd

²Div Oral Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

³Div Crown Bridge, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Acute spinal cord injury (SCI) is a traumatic injury that can either result in a contusion, a partial tear, or a complete transection in the spinal cord. Thus, the goal of the current treatment approach is to repair the fractured vertebra and prevent secondary damage. Dental pulp stem cells can differentiate into functionally active neurons in vitro under defined conditions. In the present study, rat dental pulp cells were transplanted into the acutely injured SCI using contusion models that are similar to the SCI observed clinically in humans. Dental pulp cells were grafted into the spinal cord at the lesion epicenter or at rostral and caudal sites, and their effects were evaluated using the BBB score. The animals that received dental pulp cell grafts in the lesion epicenter and rostral site exhibited a significantly higher BBB score compared with the animals that received grafts in the caudal site. Importantly, the superior recovery of the animals was evident at one week after the operation. These results demonstrate that the transplantation of dental pulp cells into the lesion epicenter and rostral site during the acute phase of an SCI significantly improves the recovery of hind limb locomotor function.

Conflict of Interest: The authors have competing interests with this presentation.

O1-D20 根尖乳頭組織由来幹細胞の象牙質形成に対するアスピリンの影響

○田中 陽介, 山座 孝義, 友田恵利佳, 園田聡一郎, 上原 範久, 久本由香里,
久木田敏夫

九大 院歯 分子口腔解剖

【目的】根尖乳頭組織由来の幹細胞 (Stem Cells from Apical Papilla: SCAP) は, 歯根未完成歯の根尖部乳頭組織から単離された間葉系幹細胞である. SCAP は, 優れた象牙芽細胞への分化能力ならびに象牙質形成力を有し, 歯根形成に重要な役割を果たす事が示唆されている. また, 非ステロイド系抗炎症剤の一つであるアスピリンが, ヒト骨髓間葉系幹細胞ならびに歯髓幹細胞の骨・象牙質形成能力を増加させる事が報告されている. 本研究では, アスピリンが SCAP の象牙質形成に及ぼす影響について解析した. 【方法】健康智歯より単離された SCAP にアスピリンを添加し, SCAP の増殖能力ならびに象牙質形成能力について *in vitro* 系で検討した. 【結果】アスピリン非添加 SCAP 群と比較して, アスピリン添加 SCAP 群では, 細胞生存率・細胞増殖・ポピュレーションダブルングについて有意な差は認められなかった. 間葉系幹細胞の表面マーカーの一部はアスピリン添加群で上昇していた. 一方, 硬組織形成能力については, アスピリン非添加群と比較して, アスピリン添加群では, アリザリンレッド陽性石灰化結節の形成や象牙芽細胞マーカー Rux2, アルカリフォスファターゼ, オステオカルシン, デンチンシアロホスフォプロテインの発現が有意に上昇していた. 【考察】アスピリンは, SCAP の増殖能力を促進するよりは, むしろ SCAP の硬組織形成能力を上昇させる作用を有している事が示唆された.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Effect of aspirin on dentinogenesis of stem cells from apical papilla

○Tanaka Y, Yamaza T, Tomoda E, Sonoda S, Uehara N, Kyumoto Y, Kukita T

Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Purpose: Stem cells from apical papilla <SCAP> is developed from a tip of incomplete tooth roots and have a capacity to differentiate into odontoblasts. Aspirin is known to enhance mineralized tissue formation of bone marrow mesenchymal stem cells and dental pulp-derived stem cells. In this study we examined whether aspirin enhances cell proliferation and dentinogenesis of SCAP. **Methods:** SCAP were isolated from apical papilla of tooth roots and cultured under aspirin stimulation. **Results:** Aspirin did not induced capability of cell proliferation, cell viability and population doubling. Some mesenchymal stem cell markers were upregulated. Under dentinogenic condition, aspirin-stimulated SCAP abundantly formed Alizarin-Red-positive nodules and expressed odontoblast-specific markers including Runx2, alkaline phosphatase, osteocalcin, and dentin sialophosphoprotein in comparison with aspirin-nontreated SCAP. **Conclusion:** These findings suggest that aspirin has a potency to induce dentin formation in SCAP. **Conflict of Interest:** The authors declare no competing interests.

O1-D21 一酸化窒素によるラット歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化促進

○園田聡一朗^{1,2}, 山座 孝義¹, 友田恵利佳¹, 田中 陽介¹, 久木田敏夫¹

¹九大 院歯 分子口腔解剖

²九大 院歯 歯周

【目的】 歯髄幹細胞 dental pulp stem cells (DPSCs) は象牙質歯髄複合体の維持・修復において重要な役割を果たす。従って、DPSCs の組織再生能力を標的とした治療薬の開発は、非常に有効なう蝕治療となりうると考えられる。一酸化 nitric ac (NO) は、炎症歯髄において抗炎症的に作用するが、DPSCs に対する直接的な影響は未だ明らかではない。本研究では、DPSCs の象牙質組織再生能向上を目指し、NO が DPSCs の細胞機能、象牙芽細胞分化能に与える影響を評価することを目的とした。**【方法】** ラット新生児切歯の歯髄組織より、付着コロニー形成法によりラット歯髄幹細胞 rat DPSCs (rDPSCs) を単離した。rDPSCs に NO ドナー (NOC18), NO 消去剤 (carboxy-PTIO), NOS 阻害剤 (1400w または L-NAME) による処理を行い、細胞増殖能ならびに象牙質形成能に対する影響を評価した。**【結果】** NOC18 処理により rDPSCs の細胞増殖能・象牙質形成能が向上した。一方で、NO 消去剤の carboxy-PTIO による処理によって NOC18 処理群、未処理群のどちらにおいても細胞増殖能・象牙質形成能は有意に抑制された。さらに、NOS の抑制剤である 1400w と L-NAME による処理を行っても、NOC18 処理による rDPSCs の機能向上は維持された。**【考察】** これらの結果から、外因性の NO による rDPSCs の細胞増殖能・象牙質形成能の向上は、内因性に産生された NO と独立して作用する事が考えられた。従って、象牙質組織再生治療において、NO は新たな DPSCs 標的薬として非常に有望であると示唆される。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Nitric oxide accelerates dentinogenic capacity of rat dental pulp stem cells

○Sonoda S^{1,2}, Yamaza T¹, Tomoda E¹, Tanaka Y¹, Kukita T¹

¹Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Periodontol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Purpose: Dental pulp stem cells (DPSCs) are considered to play an important role in maintaining and repairing dentin/pulp-complex. Improvement of DPSCs regenerative capacity might be a promising therapeutic strategy for dental caries treatment. Nitric oxide (NO) is known to function anti-inflammation, meanwhile the direct effect on DPSCs has not been clarified. In this study, we examined the effects of NO on cell proliferation and dentinogenesis of DPSCs. **Methods:** We isolated DPSCs from neonatal rat incisors, rat DPSCs (rDPSCs), and examined the effect of NO donor (NOC18), NO scavenger (carboxy-PTIO) and NOS inhibitors (1400w or L-NAME) on cell proliferation and dentinogenesis. **Results:** We found that NOC18 accelerated cell proliferation and in vitro dentinogenesis of rDPSC. On the other hand, carboxy-PTIO suppressed these functions in presence or absence of NOC18. Furthermore, 1400w and L-NAME did not suppress NOC 18 accelerated functions. **Conclusion:** These findings suggest that exogenous NO improves cell proliferation and dentinogenesis of rDPSCs independent of endogenous NO action. Therefore, NO treatment might be a promising therapeutic strategy for dentin regeneration in endodontics. **Conflict of Interest:** The authors declare no competing interests.

O1-D22 3次元培養される骨髄間葉系幹細胞集塊 Clumps of a MSC/ECM complex (C-MSC)における YAP/TAZ シグナルの解析

○小松 奈央, 加治屋幹人, 藤田 剛, 栗原 英見

広大院医歯薬保 歯周

【目的】 骨髄間葉系幹細胞集塊 Clumps of a MSC/ECM complex (C-MSC)は、骨髄間葉系幹細胞 (MSC) の細胞外基質 (ECM) を豊富に産生する条件で3次元培養して得られる。C-MSCは、細胞機能を調節したのちに人工足場材料を用いずに移植が可能で、効果的な組織再生能を示す (Cytotherapy,2015)。3次元培養は細胞にメカノトランスダクションを誘導する。メカノトランスダクションは細胞分化の制御に関わる転写制御因子 YAP/TAZ の活性に影響を与えることが明らかになりつつある。そこで、本研究ではC-MSC中のMSCにおけるYAP/TAZの発現動態について分析した。

【方法】 ヒトMSCs (R41, R52, RIKEN) を24穴培養皿に 2.0×10^5 cells/wellで播種し、50 μ g/ml アスコルビン酸含有の増殖培地にて5日間培養し十分なECMを産生させた。これを鈍的に剥離し、細胞シート状態で浮遊させ、さらに増殖培地で培養してC-MSCを得た。この培養過程におけるYAP/TAZの局在と活性化について、免疫染色法、western blotting法、qPCR法によって解析した。

【結果と考察】 C-MSC作製過程における細胞シート剥離直後や、浮遊培養早期には、YAP/TAZは細胞質および核の双方に分布していたが、培養5日後には細胞質のみに限局していた。また、培養時間依存的にYAP/TAZの発現量が減少し、同様にリン酸化されたYAP/TAZの増加を認めた。さらに、YAP/TAZが制御する3遺伝子についても、時間依存的にその発現量の減少を認めた。以上から、C-MSCにおけるメカノトランスダクションが、MSCsのYAP/TAZの核外移行を促進し、その活性を減弱させる可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

YAP/TAZ signaling in 3D culture clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complex

○Komatsu N, Kajiya M, Fujita T, Kurihara H

Dept Periodontal Med, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Purpose:

Three-dimensional cell culture clumps of mesenchymal stem cells (MSCs)/extracellular matrix complex (C-MSC) can be regulated the cellular function in vitro and be transplanted into tissue lesions without artificial scaffold to induce tissue regeneration (Cytotherapy, 2015). Three-dimensional culture microenvironment induces mechanotransduction. Especially, the transcriptional factor YAP/TAZ plays a role in MSCs cellular function as the mechanotransducer. Accordingly, we have investigated the activity of YAP/TAZ signaling in C-MSC.

Methods:

MSCs were seeded at a density of 2.0×10^5 cells/well into 24-well plates and cultured with growth medium supplemented with 50 μ g/ml L-ascorbic acid for 5 days. To obtain C-MSC, confluent cells were scratched using a micropipette tip to roll up the cellular sheet. Then, the C-MSC was maintained in growth medium for 5 days. The localization and activity of YAP/TAZ in C-MSC were analyzed.

Results and Discussion:

Immediately after scratching, YAP/TAZ were distributed throughout cytoplasm and nucleus. However, those localization changed to predominantly cytoplasmic in cells during the C-MSC culture. The expression level of YAP/TAZ, which were mainly phosphorylated, were decreased and the endogenous YAP/TAZ target genes were also reduced after making C-MSC. These findings suggested that the mechanotransduction in C-MSC induces YAP/TAZ localization to cytoplasm and attenuates those activity.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D23 口唇口蓋裂患児由来乳歯幹細胞の解析

○山座 孝義¹, 山座 治義², 園田聡一郎¹, 友田恵利佳^{1,2}, 田中 陽介¹, 上原 範久¹,
久本由香里¹, 野中 和明², 久木田敏夫¹

¹九大 院歯 分子口腔解剖

²九大 院歯 小児口腔

【目的】口唇口蓋裂は、発生時の頭部突起の融合不全により生じる高頻度の先天性奇形である。種々の原因が考えられているが、突起部に移動する頭部神経堤細胞由来の間葉系細胞の機能不全も疑われている。乳歯幹細胞と顔面や口蓋の突起の間葉を形成する細胞は、同じ起源（頭部神経堤細胞）であることから、本研究では、口唇口蓋裂患児の乳歯幹細胞の幹細胞学的機能を解析する事で、口唇口蓋裂の発症を解明することを目的とした。【方法】口唇口蓋裂患児3名の脱落乳歯に残存する歯髓組織から、付着コロニー形成法により乳歯幹細胞を単離培養した。免疫学的特性や細胞増殖能、多分化能に関する解析を健常児乳歯幹細胞と比較検討を行った。【結果】口唇口蓋裂患児由来乳歯幹細胞は、コロニー形成能や細胞増殖能、ポプレーションダブリングは健常児乳歯幹細胞と比較して非常に低下していた。細胞表面抗原の解析から、口唇口蓋裂患児由来乳歯幹細胞では、間葉系幹細胞と同様のマーカーが発現してしたが、多くのマーカーでは発現が低下していた。また、口唇口蓋裂患児由来乳歯幹細胞では、象牙芽細胞分化能、軟骨細胞分化能、脂肪細胞分化能も非常に低下していた。細胞内シグナルの状態も変化を来している分子も観察された。【考察】以上の結果から、健常児乳歯幹細胞と比較して、口唇口蓋裂患児由来乳歯幹細胞は幹細胞学的に機能が劣る事から、この細胞を利用した解析が口唇口蓋裂発症の糸口となりうる可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Analysis of deciduous teeth-derived stem cells from patients with cleft lip and palate

○Yamaza T¹, Yamaza H², Sonoda S¹, Tomoda E^{1,2}, Tanaka Y¹, Uehara N¹, Kyumoto Y¹,
Nonaka K², Kukita T¹

¹Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Pediatr Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Purpose: Cleft lip and palate (CL/P) is a common congenital disease because of dysfusion of orofacial processes. Cranial neural crest cell derived-mesenchymal cells in the processes exhibited impaired cell function. The origin of deciduous teeth-derived stem cells is also cranial neural crest cells. In this study, we isolate stem cells from deciduous teeth of CL/P patients and examined the stem cell function. **Method:** We isolate stem cells from deciduous teeth of three patients with CL/P and analyzed the stemness including colony-formation, cell proliferation and multipotency. **Results:** Stem cells from deciduous teeth of three patients with CL/P expressed reduced capacities of colony-formation and cell proliferation. They also expressed mesenchymal stem cell markers, but the expressional rate was impaired. Stem cells from deciduous teeth of three patients with CL/P were capable of differentiating into odonto/osteoblasts, chondrocytes and adipocytes, but the matured rate was also impaired when compared with stem cells from deciduous teeth of healthy donors. **Conclusion:** Stem cells from deciduous teeth of three patients with CL/P expressed impaired function in comparison with stem cells from deciduous teeth of healthy donors. Stem cells from deciduous teeth of three patients with CL/P might be useful to elucidate the mechanism of CL/P development.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D24 Runx シグナリングは一次口蓋と二次口蓋の融合に Tgfb3 を介して関与している

○Sarper Safiye, 黒坂 寛, 三原 聖美, 青山 剛三, 山城 隆
阪大 院歯 矯正

Runx signaling is specifically involved in the fusion between the primary palate and the secondary palate by regulating Tgfb3 signaling

○Sarper S, Kurosaka H, Mihara K, Aoyama G, Yamashiro T
Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

The mammalian palate is formed from the primary and the secondary palate and the failure in fusion at this boundary causes anteriorly-limited cleft palate. It is known that palatal fusion is regulated in different manner in the anterior-posterior axis, however, it should be still addressed more how the primary palate fuses with secondary palate. *Runx1* is a member of the *Runx* family genes, which is known to be a master transcription factor for hematopoietic development. Recent studies demonstrated that *Runx* signaling is also associated with morphogenesis of various developing organs. We previously showed that *Runx1* is specifically expressed at the fusing epithelium during palatogenesis and *Runx1* deficiency results in incomplete clefting only at the anterior junction between the primary and the secondary palate, but not in the junction between the palatal process in the secondary palates. **Purpose:**In this study we investigated the mechanisms of *Runx1*-associated palatal fusion including molecular network using epithelial specific *Runx1* knock out mice. **Materials & Methods:**We generated epithelial specific knock out mouse using Cre-loxp (K14 Cre *Runx1*^{fl/fl}) system. Whole mount in situ hybridization method is used for examine anterior palate specific genes. In order to quantify gene expression difference we use laser microdissection system on E15 palate. We use TGFB3 soaked beads to rescue palate of K14 Cre *Runx1*^{fl/fl} mouse. **Results & Conclusion:**Similar to our previous report, K14Cre;*Runx1*^{fl/fl} mice exhibited anteriorly-limited cleft palate which suggests region specific association of *Runx1* during palatal fusion. Interestingly, *Tgfb3* which plays critical roles during palatal fusion showed significant downregulation only in the primary palate, but not in the secondary palate. Such temporospatial downregulation of *Tgfb3* also accompanied the downregulation of *Mmp-13* and *Fgf9*. In addition, reintroduced TGFB3 rescued the defects in the fusion of the mutant palate in the culture. These results suggest epithelial *Runx1* during palatogenesis regulates expression of *Tgfb3* in a region specific manner that is governing anterior palatal fusion.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D25 レチノイン酸シグナルと Shh シグナルの相互作用が顔面形成に及ぼす役割

○Wang Qi, 山城 隆, 黒坂 寛
阪大 院歯 矯正

Retinoic acid affects craniofacial patterning by regulating sonic hedgehog signaling

○Wang Qi, Yamashiro T, Kurosaka H

Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

Purpose: Excessive intake of retinoic acid (RA) or its precursor, vitamin A, during early pregnancy is associated with increased incidence of craniofacial defects in offspring. However, the pathogenetic mechanism of abnormal craniofacial development caused by excess RA is not fully understood. The aim of the present study is to investigate the effects of excess RA on early craniofacial development in mouse fetuses and analyze the teratogenic mechanism. **Materials & Methods:** We gave all-trans RA (25 mg/kg body weight) to ICR pregnant mice by gastric intubation at embryonic day 8.5, 9.5 and 10.5, and harvested embryos at E11.5. **Results & Conclusion:** It was found that mice with maternal retinoic acid treatment exhibit abnormal craniofacial development including cleft palate, anomalies in the basisphenoid and basioccipital bones, Syngnathia, Micrognathia, ect. Moreover, we discovered that expression of Sonic hedgehog (Shh), and its downstream genes Ptch1 and Gli 1 were reduced around palatal region and the pituitary fossa of RA-treated embryos. Furthermore, the incidence of cleft palate and anomalies in the basisphenoid and basioccipital bones due to overdose RA was reduced by administration of SAG (Shh signaling agonist). Thus, our results suggest that one of the pathogenesis of cleft palate and anomalies in the basisphenoid and basioccipital bones after excessive RA exposure is likely to be associated with the downregulation of Shh signaling pathway.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O1-D26 転写因子 Hand2 はホメオボックス型転写因子群の発現調節を伴って上顎を下顎へ形質転換する

○船戸 紀子

医科歯科大 医歯共同セ 疾患遺伝子

【目的】顎顔面に症状を持つ症候群では、下顎の形態異常を伴うことが多い。現在の脊椎動物のほとんどは、下顎を持った新しいグループ、顎口類である。脊椎動物は、顎骨の獲得により捕食機能が増強したことで大きく進化した。顎の形成は、鰓弓組織のどこに上下顎に特異的な遺伝子が発現するかでコントロールされる。bHLH型転写因子 Hand2 および Hand1 は、第一鰓弓のうち下顎鰓弓特異的に発現する。本研究では、下顎発生に関わる転写制御ネットワークを解析した。【方法】組織特異的に Hand2 および Hand1 を強制発現する遺伝子改変マウスをそれぞれ形態学的に解析した。野生型、Hand2 遺伝子改変マウス胎児を採取し、トータル RNA を抽出した後、マイクロアレイにて Hand2 が発現調節する遺伝子群についてオントロジー解析を行った。また、変化が認められた遺伝子群について、野生型および遺伝子改変マウス胎児の whole-mount *in situ* hybridization を行い、発現解析を行った。【結果】Hand2 を上顎鰓弓に異所性に発現させると、浸透率 100% で二次口蓋を含む上顎骨が消失し、下顎へと形質転換された。上顎鰓弓に Hand1 を強制発現させた Hand1 遺伝子改変マウスでも表現型は弱いが同様の所見を認めた。野生型と比較して、Hand2 遺伝子改変マウスではホメオボックス型転写因子群の発現変化が顕著であった。野生型と Hand2 遺伝子改変マウスの上下顎突起において、ホメオボックス遺伝子群の局在の変化が確認された。【結論】Hand2 はホメオボックス型転写因子群の発現調節を伴って上顎を下顎へ形質転換した。Hand 転写因子が顎の形成に関わる重要な因子であることから、進化の段階で下顎の獲得に関わった可能性がある。(非会員共同研究者：小久保博樹，中村正孝，柳沢裕美，相賀裕美子)
【利益相反】利益相反状態にはありません。

Hand2 transforms upper jaw to lower jaw by regulating the expression of homeobox transcription factors

○Funato N

Res Center for Med and Dent Sci, Tokyo Med Dent Univ

Syndromic craniofacial malformations often accompany jaw anomalies in humans. Acquisition of the mandible was evolutionarily important for jawed vertebrates. The basic helix-loop-helix transcription factors Hand2 and Hand1 are conserved among jawed vertebrates. Hand proteins are expressed in neural crest in the mandibular process but not in the maxillary process of the first branchial arch. Here, we provide evidence that Hand2 is sufficient for maxilla-to-mandible transformation by regulating the expression of homeobox transcription factors in mice. Altered Hand2 expression in the neural crest transformed the maxillae into mandibles with duplicated Meckel's cartilage, which resulted in an absence of the secondary palate. Whole-mount *in situ* hybridization showed that non-Hox homeobox transcription factors were dysregulated in Hand2-overexpressing mutants. These results suggested that Hand2 regulates the mandibular development through Hand2-downstream genes and is therefore a major determinant of jaw identity. (Non-Member Collaborators: Hiroki Kokubo, Masataka Nakamura, Hiromi Yanagisawa, and Yumiko Saga)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C1 唾液腺の形態形成における性差と Runx1 の制御機構について

○小野 瞳¹, Sarper Safiye², 山城 隆², 阪井 丘芳¹

¹阪大 院歯 顎治

²阪大 院歯 矯正

【目的】性ホルモンの生理的役割や臓器形態形成の性差を理解することは、男女それぞれに好発する疾病の予防や治療戦略を立てる上で重要である。唾液腺疾患の罹患には性差があり、性ホルモンと唾液分泌能の関係が示唆されているが詳細な分子機序は不明な点が多い。本研究は性ホルモンと関与が示唆される Runx1 に注目し、唾液腺の形態形成にアンドロゲンが関わる役割を検討した。【方法】WT マウス唾液腺における Runx1 の局在を免疫組織染色と in situ hybridization 法で確認した。また Runx1 を上皮特異的に欠損させたマウス (Runx1cKO) および、性器を摘出したマウスを作成し検討を行った。機能学的解析として M3 受容体刺激による唾液分泌量測定を行い、作成した Runx1cNO と WT との比較を行った。また HE 染色と免疫組織染色による形態学的解析および、リアルタイム RT-PCR を用いた唾液腺マーカーの遺伝子発現を検討した。さらにアンドロゲンと形態形成の分子機構を解明するため、血中ホルモン測定および RT-PCR を用いたアンドロゲン依存的なマーカー *Crisp3* の解析を行った。【結果】Runx1 は顎下腺の導管、特に細胞増殖因子を分泌する顆粒性導管に強く発現していた。また Runx1cKO の成体雄マウスでは唾液分泌量の低下を認め、免疫組織染色で水チャネル AQP5 の局在に変化が認められた。形態学的比較において Runx1cKO では顆粒性導管の割合が顕著に減少しており、それに伴う細胞増殖因子 *Egf*, *Ngf* の発現低下が認められた。胎生期、二次性徴前の雄マウスや成体雌マウスでは異常は認められなかった。さらに、Runx1cKO の雄マウスでは血中アンドロゲンに変化はないが、唾液腺組織中の *Crisp3* の遺伝子発現が低下していた。【考察】Runx1cKO における唾液腺の機能的低下および導管形成不全を認めたことから、唾液腺の導管形成は二次性徴のアンドロゲン依存的に制御され、Runx1 が導管形成および分化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The role of Runx1 in the salivary gland morphogenesis

○Ono H¹, Sarper S², Yamashiro T², Sakai T¹

¹Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

Here we address dominant roles of Runx1 in androgen-dependent sexual dimorphism in the SMG. Runx1 was specifically distributed in the duct basal cells of the SMG. Runx1 deficient male mouse exhibited involution of GCT in SMG with downregulated expression of *Ngf* and *Egf*, its marker genes and *Crisp3*, an androgen-dependent transcript. Circulating testosterone levels were not affected in the mutant, indicating that the duct phenotypes could be direct effect of epithelial Runx1 deficiency. Such salivary gland phenotypes are not evident in the female mutant SMG or in prepubertal mutant SMG at P17. These salivary phenotypes are analogous to that of *Cbfb*, indicating that dominant partner of *Cbfb* is Runx1. On the other hand, saliva flow rates were decreased in the mutant male mice. In the mutant male SMG, expression of Aquaporin 5 (Aqp5), the main water channel protein, were not deviated, however, aberrant shape of AQP5-immunoreactive protein were abundantly stuck in the cytoplasm of the mutant acini. Such findings were male specific but independent to androgen-pathway, because ORX acini did not demonstrate such findings. Thus, Runx1-Cbfb signaling is involved in the sexual dimorphism in SMG.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C2 ラット舌下腺の出生前後に存在する数種の分泌顆粒に関する内因性ペルオキシダーゼ活性の分析電子顕微鏡分析

○盛口 敬一, 本田 雅規

愛院大 歯 口腔解剖

成獣ラット舌下腺終末部は形態的特徴から粘液細胞と漿液細胞の2種類により、構成されている。我々は3,3'-diaminobenzidine (DAB) による内因性ペルオキシダーゼ(PO)活性検出による電顕的観察において、耳下腺、顎下腺に比べ、胎生19日目で二相性顆粒が出現し、21日目にはPO活性が均一な分泌顆粒を有する漿液細胞の存在が明らかで、腺腔への外分泌を示した。その後、中間型の漿粘液細胞を経て粘液細胞に分化するものと、最終的に漿液細胞の形態はとどめているが、分泌顆粒のみならず細胞小器官のPO活性も消失することを我々はすでに報告している。さらにDAB反応に伴う窒素(N)の存在に注目し、分析電顕にてNを追求した結果、明らかに消失していることが証明された。一方、胎生期から生後の早期にかけて数種類の形態の違いを示す分泌顆粒の存在について、KikuchiらやWolffらの報告がある。しかしそれらの動向について不明な点も多い。そこで、胎生期から生後の舌下腺を採取し、2% GA-2% PFA混合固定後、DAB反応(0.1% DAB, 0.01% H₂O₂)を行なった。反応後OsO₄の後固定の後、脱水、Quetol 653樹脂包埋を行なった。超薄切片を作製し、分析電顕によるNのマッピング、元素の定性、定量を行なった。その結果、胎生20日目の舌下腺において、均一で電子密度の高い漿液細胞の顆粒、不均質で電子密度がやや低い顆粒、芯状を呈する二相性の顆粒が認められた。これらの分泌顆粒についてNの存在を分析電顕で観察してみると強弱の差はあれ、存在が確認された。従ってこれらの分泌顆粒はPO活性を有する移行型の細胞である漿粘液細胞が、分化の途中に示す変化を観察したものであると考えられる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Peroxidase activity of several types granules of pre- and postnatal rat sublingual glands by analyze electron microscopy

○Moriguchi K, Honda M

Div Oral Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Changes in sublingual gland endogenous peroxidase activity of developing rat sublingual glands were investigated using histochemical electron microscopic techniques. The use of 3-3'-diaminobenzidine tetrazolium (DAB) is an important classical histochemical method for detecting the localization of endogenous peroxidase activity. Here, we attempted to demonstrate the relationship between secretory granules (SG) and endogenous peroxidase activity in pre- and postnatal rat sublingual glands. A scanning-transmission electron microscope (STEM) was used to conduct energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis of the presence of nitrogen generated by the DAB reaction in SG with homogeneous high electron density, mottled SG with heterogeneous electron density and bipartite structures consisting of a dense body (or core) SG. The mapping patterns of nitrogen were restricted to these SG. That is, we detected endogenous peroxidase activity in several types of SG from acinar cells of sublingual gland. The results of this histochemical technique applied to these types granules of rat sublingual gland acinar cells showed that these are seromucous cells, intermediate cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C3 ヒト全唾液における Basic Proline Rich Lacrimal Protein (BPLP) の動態解析

○瀬賀 拓哉¹, 今井あかね², 加藤 哲男³, 斎藤 英一¹

¹新潟工大 院工

²日歯大新潟短大 歯科衛生

³東歯大 化学

【目的】オピオルフィン(QRFSR)は抗うつ作用や鎮痛作用を発揮する生理活性ペプチドであり、Basic Proline Rich Lacrimal Protein (BPLP) のアミノ末端5残基に相当する。BPLP 遺伝子 (PROL1) の転写産物は RNA の段階で PROL1-001 (前駆体 248 残基・シグナルペプチド 21 残基) や PROL1-201 (200・21) などの複数の mRNA に再編集される。それゆえ、オピオルフィンの親タンパク質はバイオマーカーの候補として有望である。本研究では、ヒト全唾液における BPLP の動態を解析したので報告する。【材料と方法】新潟工科大学研究倫理委員会の承認を得て、健常者から氷冷試験管中に全唾液を採取した。直ちに、遠心分離 (4 °C, 12,000 rpm, 20 min) により上清画分を集め、強塩基性陽イオン交換樹脂で分画した。次いで、0.5, 0.75, 1.0M NaCl 溶出画分を逆相クロマトグラフィー (CAPCELL PAK C18) で分離した。各精製画分にトリプシン消化を施し、発生したトリプシン消化断片をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法で解析した。さらに、PROL1 抗体 (Abnova 社製) を用いて各個人の唾液の ECL-ウェスタンブロット解析も実施した。【結果と考察】精製タンパク質のトリプシン断片を解析したところ、WVPPSPPPPYDSRLNSPLSLPFVPGR (PROL1-001/-201; 44-69 残基), MKLTFFLGLLALISCFT-PSESQR (PROL1-001/-201; 1-23), KLTFLLGLLALISCFTPSESQRFSR (PROL1-001/-201; 2-26), ACHLHISSNPR (PROL1-201; 187-197) が同定された。この結果は BPLP が唾液腺で発現された後、全唾液中で多様なプロテオリシスを受けることならびに BPLP の一部が全唾液中のエクソソーム II に由来する可能性を示唆する。なお、市販の PROL1 抗体で BPLP を鮮明に検出することはできなかった。本研究の一部は JSPS 科研費 (No.15K11063) に支援された。【会員外共同研究者】新潟大 院自然 谷口 正之 教授

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Characterization of dynamic features of basic proline rich lacrimal protein (BPLP) in human whole saliva

○Sega T¹, Imai A², Kato T³, Saitoh E¹

¹Grad Sch Technol, Niigata Inst of Technol

²Dept Dent Hygiene, The Nippon Dent Univ Coll at Niigata

³Dept Chem, Tokyo Dent Coll

The amino terminal QRFSR sequence of Basic Proline Rich Lacrimal Protein (BPLP) is opiorphin displaying antidepressant and antinociceptive activities. Therefore its parent protein could be a promising biomarker in human body fluids. To utilize this candidate as a biomarker, we have characterized dynamic features of BPLP that is encoded by the PROL1 gene using proteomic approaches. Human whole saliva was collected from volunteers with the approval of the Research Ethics Committee. The supernatant fraction of whole saliva was collected by centrifugation (12,000 rpm, 4 °C, and 20 min). Then, salivary basic components were purified by 2D-liquid chromatography. The purified components were digested with trypsin, and the resulting tryptic peptides were analyzed by MALDI-TOF-MS. Salivary BPLP was examined by western blot with anti-PROL1 antibody (Abnova). The employed antibody was not able to detect salivary BPLP. The tryptic peptide WVPPSPPPPYDSRLNSPLSLPFVPGR (PROL1-001/-201;44-69 a. a.), MKLTFFLGLLALISCFTPSESQR (PROL1-001/-201; 1-23), KLTFLLGLLALISCFT-PSESQRFSR (PROL1-001/-201;2-26), and ACHLHISSNPR (PROL1-201; 187-197) were found. **These results suggest two possibilities:** (1) BPLP in whole saliva is subjected to proteolysis. (2) Precursor protein of BPLP from exosome II may be present in this preparation. Supported by JSPS grant (# 15K11063) in part. Non-member co-worker: Prof. Taniguchi M. (Graduate School, Niigata University)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C4 耳下腺腺房細胞における α_1 -アドレナリン受容体刺激と低張による AQP5 の細胞内移動

○Bragiel Aneta, Pieczonka Tomasz, 石川 康子

徳大 院医歯薬 分子薬理

【目的】耳下腺腺房細胞のムスカリン受容体や α_1 -アドレナリン受容体(AR)が刺激を受容すると水チャネル・アクアポリン(AQP)5は細胞内移動して管腔膜に集積し、唾液分泌を促進する。一方、種々の臓器にて高または低浸透圧により AQP5 は細胞内移動することが報告されている。そこで、 α_1 -アドレナリン受容体刺激性 AQP5 の細胞内移動のメカニズムを種々の浸透圧条件下で研究した。【方法】12週齢ラットに特異的、非特異的 α_1 -AR 遮断薬の存在下で phenylephrine を投与し、経時的に耳下腺を摘出、AQP5, GM1, E-cadherin を免疫染色して共焦点顕微鏡で解析した。耳下腺切片を高張、等張、低張の緩衝液を用い、種々の阻害薬の有無の下で phenylephrine と反応させた。MgCl₂を用いて管腔膜を分画し、Western blot 解析した。【結果と考察】phenylephrine は α_{1A} -AR サブタイプを介して AQP5 を管腔膜や側膜へ細胞内移動させた。この移動は ODQ や KT5823 により阻害されることから、NO/cGC/PKG の関与が示唆された。高張ではなく、低張にすると、AQP5 は管腔膜へ移動し、この移動は ruthenium red で阻害され、細胞外からの Ca²⁺流入の関与が示唆された。等張でも低張でも phenylephrine により AQP5 は管腔膜へ移動し、この移動は La³⁺により阻害され、細胞内貯蔵部位からの Ca²⁺遊離の関与が示唆された。等張でも低張でも phenylephrine による管腔膜への AQP5 の移動の応答性は同じであった。【結論】細胞外液を低張にすると、細胞外から細胞質への Ca²⁺流入により AQP5 は管腔膜へ移動する。一方、等張下でも低張下でも、phenylephrine は細胞内貯蔵 Ca²⁺を細胞質へ遊離して AQP5 を管腔膜へ移動させる。【利益相反】利益相反状態にはありません。

Alpha 1-adrenoceptor agonist- and hypotonicity-induced trafficking of AQP5 in rat parotid acinar cells

○Bragiel A, Pieczonka T, Ishikawa Y

Dept Med Pharmacol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

Purpose: In parotid glands, activation of α_1 -adrenoceptors (ARs) induces a rapid increase in AQP5 in apical plasma membrane (APM). In several tissues, hyper- and hypotonicity have been reported to induce the trafficking of AQP5. We examined mechanisms of α_1 -AR-induced trafficking of AQP5 under different osmolality. **Methods:** Immunofluorescence microscopy and Western blot analysis were used to analyze AQP5 levels in the APM. **Results & Conclusion:** Phenylephrine-induced trafficking of AQP5 to the APM and lateral plasma membrane (LPM) was mediated via α_{1A} -AR subtype. Phenylephrine-induced trafficking of AQP5 was inhibited by ODQ and KT5823, indicating the involvement of NO/cGC/PKG signaling. Under isotonic conditions, phenylephrine-induced trafficking was inhibited by La³⁺, implying the participation of store-operated Ca²⁺ channel. Under hypotonic conditions, phenylephrine-induced trafficking of AQP5 to the APM was higher than that under isotonic conditions. Under non-stimulated conditions, hypotonicity-induced trafficking of AQP5 to the APM was inhibited by ruthenium red, suggesting the involvement of extracellular Ca²⁺ entry. Thus, α_{1A} -AR activation induced the trafficking of AQP5 to the APM and LPM via Ca²⁺/cGMP/PKG signaling, which is associated with store-operated Ca²⁺ entry. The responsiveness of AQP5 trafficking to an α_1 -AR agonist under hypotonic condition was the same as that under isotonic condition.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C5 アセチルコリンによる顎下腺の Ca^{2+} オシレーションにおける腺血流動態の影響

○根津 顕弘¹, 森田 貴雄¹, 石井 久淑², 谷村 明彦¹

¹北医療大 歯 薬理

²北医療大 歯 生理

【目的】アセチルコリン (ACh) を持続的に静脈投与すると顎下腺全体で同期した Ca^{2+} オシレーションが惹起される。本研究では、この Ca^{2+} オシレーションの発生機構を解明するため、顎下腺の Ca^{2+} 動態と血流変化の生体イメージングによる解析を行った。【方法】ラット顎下腺の開口部から逆行性にウイルスベクターを注入し、腺房細胞に蛍光 Ca^{2+} センサー (YC-Nano50) を導入した。麻酔したラットの顎下腺を露出し、薬物投与による Ca^{2+} 応答をマクロズーム顕微鏡で測定した。また顎下腺の血流変化は二次元レーザー血流計を用いて測定した。【結果】低濃度 ACh (6×10^{-8} mol/min) の静脈内投与により顎下腺全体で同期した Ca^{2+} オシレーションが観察された。この Ca^{2+} オシレーションはムスカリン受容体拮抗薬で完全に抑制され、自律神経節遮断薬および α アドレナリン受容体拮抗薬では影響されなかった。以上の結果は、 Ca^{2+} オシレーションの発生にニコチン受容体を介した自律神経系の影響が無いことを示唆する。顎下腺 Ca^{2+} と血流動態を同時測定により、 Ca^{2+} オシレーションと血流変化がよく一致することが明らかとなった。ACh による顎下腺の Ca^{2+} 応答と血流のオシレーションは、 Ca^{2+} 拮抗薬、アンジオテンシン II (AT_1) およびトロンボキサン A_2 (TXA_2) 受容体拮抗薬の前投与により持続的な上昇に変化した。【まとめ】顎下腺の Ca^{2+} 応答と血流動態の生体イメージングにより、ACh によって惹起される顎下腺全体で同期した Ca^{2+} オシレーションの発生に、 AT_1R および TXA_2 受容体を介した血管収縮による腺血流変化が重要な役割を果たすことが明らかとなった。現在、この手法を用いて代償性に肥大した顎下腺の唾液分泌亢進のメカニズムについて解析しており、その結果についても紹介する。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Involvement of hemodynamics on acetylcholine-induced tissue-wide synchronization of Ca^{2+} oscillations in rat submandibular gland

○Nezu A¹, Morita T¹, Ishii H², Tanimura A¹

¹Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

²Div Physiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

To clarify the mechanism of acetylcholine (ACh)-induced Ca^{2+} oscillations with tissue-wide synchronization in submandibular gland (SMG) *in vivo*, we monitored ACh-induced Ca^{2+} responses and blood flow (BF) in rat SMG using the intravital Ca^{2+} imaging system and the laser speckle imaging flowmeter. The infusion with low doses of ACh (6×10^{-8} mol/min) induced tissue-wide synchronization of Ca^{2+} oscillations in SMG. These Ca^{2+} oscillations were completely blocked by atropine, but not by hexamethonium or prazosin. These results exclude the possible involvement of nicotinic effect of ACh on a sympathetic ganglion. Simultaneous monitoring of BF and Ca^{2+} responses in SMG demonstrated that the ACh-induced changes in BF were synchronized with Ca^{2+} oscillations. Preadministration of Ca^{2+} -channel blockers strongly reduced the frequency of ACh-induced Ca^{2+} oscillations and synchronized fluctuation of BF changes. Furthermore, ACh-induced oscillations of Ca^{2+} and BF were changed to sustained rise by irbesartan or seratrovast. Real-time monitoring of Ca^{2+} and BF dynamics allow us to examine the contribution of vasoconstriction via angiotensin II and thromboxane A_2 receptors on a generation of the ACh-induced Ca^{2+} oscillations in SMG. Using these techniques, we have been investigating a mechanism of an increased salivation in compensatory hypertrophy of SMG, and will show these results.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C6 口腔乾燥治療薬の継続服用による有効性の検討

○小野 瞳, 井階 一樹, 阪井 丘芳

阪大 院歯 顎治

【目的】口腔乾燥患者に対しムスカリン受容体刺激薬ピロカルピン塩酸塩(以下ピロカルピン)を推奨量服用すると、発汗や嘔気などの副作用が発現し治療継続が困難となる場合がある。当院では副作用軽減を目的に投与量を少量から開始する方法を採用しており、今回投与量およびパターンを検証する目的で、有効性と安全性を後方視的に検討した。さらに、ピロカルピン継続服用の有効性と機序を検討するため、マウスによる分子生物学的解析を行ったので併せて報告する。【方法】2011年からの4年間に大阪大学歯学部附属病院ドライマウス外来にてピロカルピンによる服用治療を行ったシェーグレン患者について診療録を参考に患者背景・服用量・副作用・サクソテストによる唾液分泌量・VASを調査した。ICRマウスにピロカルピンを2週間経口投与し、唾液分泌に対する反復経口投与の効果および唾液腺組織の唾液腺マーカーと前駆細胞マーカーの発現比較を行った。【結果】症例は20例(男:女=3:17)で、6例は副作用の出現などにより服用中止となったが、14例では10か月間の服用が可能であった。平均服用量は 5.25 ± 1.3 mg/日であり推奨される用量より少なかった。また服用量の減少に伴う唾液分泌量や自覚症状の悪化はすべての症例で認めなかった。またマウスの実験では、ピロカルピンを反復投与すると単回投与と比べて唾液分泌量が有意に増加しており、唾液腺マーカーおよび前駆細胞マーカーの発現増加を認めた。【考察】推奨量より少ないピロカルピン服用量で唾液分泌能や自覚症状の緩和が保たれており、服用量を調整することがQOLに寄与している可能性があると考えられた。動物実験により唾液分泌量の維持には反復投与が重要で、唾液腺前駆細胞の活性化が示唆された。以上の結果からピロカルピンは、患者に合わせた適切な量を設定し継続することが有効であり、前駆細胞の活性化に寄与している可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The effectiveness of Pilocarpine for dry mouth patients -long-term medication for human and mouse -

○Ono H, Ikai K, Sakai T

Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

Pilocarpine is the representative drug for the treatment of dry mouth symptoms of Sjogren's syndrome. However, because of the side effects, it is difficult to continue treatments at times. The subjects were to determine the effectiveness and safety of pilocarpine for patients. Our findings is that the salivation ability and subjective symptoms was kept with pilocarpine doses within quantity of administration, as observed by the Saxon test and the average on the Visual Analogue Scale. In addition, by using mice that take pilocarpine, we demonstrate that the effectiveness and mechanism of the pilocarpine continuation by molecular biological analysis. To analyze the effective of pilocarpine for salivary gland in mice, embryonic stem cell markers and salivary gland markers were used for qPCR and for western blotting analysis. And, the repetition dosage was important to maintenance of the quantity of salivation, and the experiments suggest that the activation of the stem cell. The above results show that the treatment of dry mouth symptoms of Sjogren's syndrome were more effective using the method of adjusted and long-term medication.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C7 軟骨組織におけるメラトニンの作用

○服部 高子, 西田 崇, 久保田 聡

岡大 院医歯薬 口腔生化

トリプトファンから生合成されるメラトニン (N-アセチル-5-メトキシトリプタミン) は、概日リズムを形成するホルモンで、その受容体 MT1 及び MT2 は、脳を含む多くの組織に存在する。これまで、骨端軟骨の生育・代謝に概日リズムが存在する可能性が考えられ、軟骨細胞に概日リズムを持つ遺伝子が発現していることが報告されているが、それら遺伝子が内軟骨性骨化に及ぼす役割については未だほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、概日リズムを制御するメラトニンの軟骨細胞の増殖及び分化に与える影響について解析した。出生直後のマウス各組織から抽出した total RNA を用いて、MT1 及び MT2 の遺伝子発現を調べたところ、骨組織のみならず、軟骨組織においてもこれら遺伝子の発現が観察された。そこで、マウス初代培養軟骨細胞にメラトニンを添加し、その影響を調べてみると、軟骨細胞の増殖だけでなく、II 型コラーゲン、アグリカン、SOX9 の軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現レベルも亢進した。一方、肥大軟骨細胞のマーカーである X 型コラーゲンの遺伝子発現レベルは逆に抑制された。これらメラトニンの効果は MT1, MT2 の阻害剤であるルジンドールを添加すると消失した。また、メラトニン合成酵素である AANAT もマウス初代培養軟骨細胞で発現みられ、その発現量は概日リズムによって増減することが明らかとなった。さらに、ラット初代培養軟骨細胞の培養上清と細胞抽出液を質量分析計にかけたところ、メラトニンの産生が確認され、これらの結果から軟骨細胞自身が概日周期を持ってメラトニンを産生し、そのメラトニンは軟骨細胞上の MT1 及び MT2 を介して軟骨細胞の増殖及び分化を制御している可能性が考えられる。会員外共同研究者：Fu Shanqi, 林大智, 下村侑司, 高垣安紗美 (岡山大学歯学部)

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effects of melatonin on cartilage

○Hattori T, Nishida T, Kubota S

Dept Biochem Mol Dent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

Endochondral ossification events underlie a circadian rhythm. A factor which plays a pivotal role in the control of the circadian rhythm is melatonin. The effect of melatonin upon the activation of receptors MT-1 and MT-2 was observed in many tissues, but no reports exist on the effects of melatonin on cartilage. Here we report the possible role of melatonin on cartilage metabolism. Among several tissues of newborn mice, MT-1 and MT-2 receptors were detected in cartilage. Addition of melatonin to primary chondrocytes from rib cartilage of new-born mice enhanced cell growth, gene expression of Col2a1, Aggrecan, and SOX9 mRNA, but inhibited Col10a1 mRNA. Addition of Luzindole, an inhibitor of MT-1 and MT-2, abolished the melatonin effects. Surprisingly, in primary mouse chondrocytes cultured in the dark MT-1 and MT-2 mRNA as well as AANAT mRNA, a rate-limiting enzyme of melatonin synthesis, showed cyclic expression levels with the highest expression at 4 A.M., which was confirmed by mass spectrophotometric analysis using rat primary chondrocytes. These data indicate that chondrocytes express melatonin following a circadian rhythm, and that melatonin regulates cartilage growth and maturation through MT-1 and MT-2 receptors. Collaborators: Shanqi Fu, Daichi Hayashi, Yuji Shimomura, and Asami Takagaki (Okayama University Dental School)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C8 DEC1 が示す老化マウス肝臓における FGF21 の抑制作用

○Bhawal Ujjal¹, 鈴木 正敏², 藤田 裕², 内山 敏一³, 有川 量崇⁴, 渋谷 鑽², 平塚 浩一¹

¹日大松戸歯 生化・分子生物

²日大松戸歯 麻酔

³日大松戸歯 公衆予防歯

⁴日大松戸歯 社会歯 (医療情報学)

時計遺伝子の一つである Differentiated embryo chondrocytes 1 (DEC1) は、ベーシック・ループ・ヘリックス転写因子の一つであり、老化マーカーとして広く知られている。また、高齢者では、肝機能の低下により薬物動態に大きな影響を及ぼす。一方、線維芽細胞増殖因子 Fibroblast growth factor 21 (FGF21) は、肝臓で高度な発現を示す内分泌 FGF の一つである。FGF21 は肝機能の改善や長寿に関連しているが、老化した肝臓における FGF21 の機能については不明な点が多い。本研究では、老化した肝臓における FGF21 のメカニズムを企図とした。3ヵ月齢および24ヵ月齢の C57BL/6 マウスおよび DEC1 ノックアウトマウス肝臓組織を用いて、DEC1 と FGF21 の関係について解析した。老化マーカーの β -galactosidase, DEC1, p16 は、3ヵ月齢肝臓組織と比較して24ヵ月齢の肝臓組織では門脈および肝細胞にて発現増加を認めた。FGF21, ATF4 および ERK は、3ヵ月齢肝臓組織では門脈周囲に発現増加を認めたが、24ヵ月齢肝臓組織では発現低下が認められた。マウス肝臓組織における DEC1, FGF21, ATF4 の発現解析では、24ヵ月齢肝臓組織では DEC1 の発現増加を示したが、FGF21, ATF4 は発現低下を示した。24ヵ月齢 DEC1 ノックアウトマウス肝臓組織では、FGF21 および ATF4 は24ヵ月齢肝臓組織と比較して発現増加を示した。HepG2 細胞に遺伝子導入を行い、DEC1 過剰発現によって FGF21, ATF4 は発現低下を示した。一方、DEC1 siRNA による RNA 干渉によって、FGF21, ATF4 は発現増加を示した。DEC1 が FGF21 発現を抑制させるという、新しい調節機能を有する一つの因子であることが明らかとなった。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) is a novel negative regulator of hepatic fibroblast growth factor 21 (FGF21) in aging mice

○Bhawal U¹, Suzuki M², Fujita Y², Uchiyama T³, Arikawa K⁴, Shibutani K², Hiratsuka K¹

¹Dept Biochem Mol Biol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

²Dept Anesthesiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

³Dept Prevent Public Oral Health, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

⁴Dept Social Dent (Medical Informatics), Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Human differentiated embryo chondrocyte expressed gene 1 (DEC1) is frequently used as a marker of senescence *in vivo*. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is highly expressed in the liver, and FGF21-transgenic mice have extended lifespans. Thus, we hypothesized that FGF21 may play a role in the DEC1-mediated aging process. In this study, DEC1 knockout (KO) mice were used to characterize the mechanism by which FGF21 protects mice from aging. Aging is strongly diminished in DEC1 KO mice, which is reflected by decreased lipid levels and oxidative stress. The expression of FGF21 decreased with aging in wild-type mice, whereas ATF4, Phospho-ERK and Phospho-p38 expression was maintained and was accompanied by a compensatory rise of FGF21 mRNA and protein expression in DEC1 KO mice. Over-expression of DEC1 markedly abolished the hepatic expression of FGF21, and siRNA-mediated inhibition of endogenous DEC1 increased the expression of FGF21. DEC1 further diminished the expression of ATF4 in HepG2 cells over-expressing DEC1. The induction of FGF21 and ATF4 levels during the course of aging supports the view that DEC1 KO mice are able to restore the age-related imbalance of metabolism. Collectively, the data suggest that DEC1 is a novel negative regulator of hepatic FGF21 expression.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C9 オステオカルシンの代謝改善効果における GLP-1 の役割○溝上 顕子^{1,2}, 川久保-安河内 友世³, 竹内 弘⁴, 平田 雅人²¹九大 院歯 OBT 研究セ²九大 院歯 口腔細胞工学³福岡大 薬 免疫・分子治療⁴九歯大 口腔応用薬理

骨基質タンパク質であるオステオカルシン (OC) は、骨芽細胞内で合成されたのち、 γ -カルボキシラーゼによってカルボキシル化され、その大部分は骨基質として骨に埋め込まれるが、一部は血中を循環する。血中の OC のうち、3つのグルタミン酸残基がカルボキシル化されたもの (GluOC) と低カルボキシル化状態のもの (GluOC) の2つの型が存在している。内分泌作用をもつのは GluOC のみであり、インスリン分泌促進作用をはじめ、糖・脂質代謝に重要な役割を果たすことが報告されている。我々は、GluOC によるインスリン分泌促進作用の少なくとも一部は小腸内分泌細胞より分泌される glucagon-like peptide-1 (GLP-1) によるものであることを明らかにし、雌性マウスに対して長期間 GluOC を経口投与すると、空腹時血糖の低下、耐糖能の改善、および脂肪細胞の縮小が認められることを報告した。今回我々は、GLP-1 受容体欠損マウスで同様の実験を行い、GluOC による代謝改善効果は主に GLP-1 受容体を介したものであるだけでなく、GluOC が GLP-1 受容体欠損マウスの全身代謝に対してむしろ負の影響を及ぼすことを明らかにした。GLP-1 受容体欠損マウスに GluOC を長期間投与すると、耐糖能が悪化し、脂肪細胞の面積が増大したが、空腹時血糖やインスリン分泌、インスリン感受性に变化は見られなかった。野生型マウスに GLP-1 受容体阻害薬である exendin(9-39) を投与して同様の実験を行っても、GluOC による耐糖能の低下が認められた。以上のことから、GluOC のエネルギー代謝改善効果において GLP-1 シグナルが重要な役割を果たすことが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。**The role of GLP-1 in osteocalcin-mediated regulation of whole body metabolism**○Mizokami A^{1,2}, Kawakubo-Yasukochi T³, Takeuchi H⁴, Hirata M²¹OBT Res Ctr, Kyushu Univ Grad Sch Dent²Sect Mol Cell Biochem, Kyushu Univ Grad Sch Dent³Dept Immunol Mol Pharmacol, Fac Pharm Sci, Fukuoka Univ⁴Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ

Osteocalcin is a bone-derived hormone that plays an important role in glucose and energy metabolism, male fertility, and brain function in the uncarboxylated form (GluOC). It regulates energy metabolism by stimulating insulin secretion and pancreatic β -cell proliferation through its putative receptor GPRC6A. We previously reported that the effect of GluOC on insulin secretion is largely mediated by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secreted from intestinal endocrine cells in response to GluOC. Moreover, long-term oral administration of GluOC reduced the fasting blood glucose level, improved glucose tolerance, and increased the fasting serum insulin concentration as well as the β -cell area in the pancreas in female wild-type mice. In this study, we examined the effect of oral administration of GluOC using GLP-1 receptor-knockout mice and found that oral administration of GluOC for several weeks were ineffective, but rather triggered glucose intolerance and adipocyte hypertrophy without affecting the insulin tolerance. Similar phenotypes were also observed when wild-type mice were treated with GLP-1 receptor antagonist, exendin (9-39). These results indicate that the effect of GluOC on glucose homeostasis is mediated by the action of GLP-1 receptor.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C10 PI3K-Akt と mTORC1 シグナルは血管内皮細胞の伸長機能を制御する

○田村-辻 潔美, 田村 正人

北大 院歯 口腔分子生化

【目的】再生医療における臓器や組織の再建にはドナーとレシピエント組織を結ぶ新しい血管の誘導が必要不可欠である。血管は、血管内皮細胞の増殖・分化・伸長などの複雑な過程を経て形成されている。これらの過程の制御には、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の働きが重要であり、虚血部位への VEGF 投与による血管誘導が試みられている。しかし、VEGF の作用は多岐にわたるため、脆弱血管の増加などの副作用が問題となっている。そこで我々は、血管伸長に特異的に作用する化合物の同定と血管伸長制御メカニズムの解明を試みた。【方法】ES 細胞由来の血管内皮細胞は、低濃度 VEGF 環境では、敷石状の細胞形態を示し円形のコロニー (非伸張型) を形成する。一方、高濃度 VEGF 環境では細胞伸長が誘導され、血管様コロニー (伸張型) を形成する。この血管形成モデルを用いて薬剤スクリーニングを行った。【結果】低濃度 VEGF 環境において血管伸長を誘導できる薬剤として、PI3K 阻害剤 (LY294002), Akt 阻害剤 (Akt Inhibitor VIII), mTORC1 阻害剤 (everolimus, rapamycin) の 4 種の薬剤が得られた。高濃度 VEGF は野生型血管内皮細胞の血管伸長を引き起こす。一方、転写因子 Foxo1 を欠損した細胞では細胞伸長の誘導が起こらない。高濃度 VEGF で上記阻害剤の効果を検討したところ、mTORC1 阻害剤の投与によって Foxo1 欠損型の細胞伸長を回復できることが明らかになった。【考察】血管内皮細胞の伸長は、PI3K/Akt と mTORC1 による 2 つの経路によって調節されていることが示された。また、mTORC1 経路の Foxo1 への依存性は VEGF の濃度によって変化することが示唆された。【会員外共同研究者】小川 峰太郎 (熊本大)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The elongation of vascular endothelial cells is induced by the inhibition of PI3K-Akt and mTORC1 signaling

○Tsuji-Tamura K, Tamura M

Dept Oral Biochem Mol Biol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Objective: Morphological change of vascular endothelial cells, which is induced by vascular endothelial growth factor (VEGF), is an important process for angiogenesis. VEGF is a therapeutic target of tissue engineering. However, various functions of VEGF (cell growth, survival and elongation, etc.) cause harmful side effects such as hemangioma. Therefore, we attempted the identification of pathways regulating vascular endothelial cell elongation. **Methods:** We used chemical library screening during *in vitro* vascular-like elongation model of ES cells. **Results:** Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt pathway inhibitors and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) inhibitors were identified as potent inducers for endothelial cell elongation without an overdose of VEGF. In the low level of VEGF, these inhibitor-induced elongations were in dependent of transcription factor Foxo1. Interestingly, mTORC1 inhibition, but not PI3K-Akt inhibition, was able to induce endothelial cell elongation independently of Foxo1 in the high level of VEGF. **Conclusion:** These results suggested that the elongation of endothelial cell was differentially modulated depending on the VEGF concentration by two pathways: PI3K-Akt and mTORC1 pathway, a finding that may contribute to effectively control morphological change of endothelial cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C11 鶏胚を用いた脈管新生機構の形態学的解析について

○原 矢委子¹, 井上 孝二², 佐藤 哲二¹

¹鶴大 歯 解剖 II

²鶴大 歯 電子顕微鏡研究セ

【目的】脈管の形成には既存血管の増殖による血管発生(angiogenesis)と血球血管芽細胞(hemangioblast)が血管内皮に分化する脈管新生(vasculogenesis)の両者によっておこることが報告されている。卵黄囊血島由来の血球血管芽細胞は造血系細胞と血管内皮細胞の両細胞系に分化するが脈管新生機構については不明な点も多く、形態学的な解析はほとんどなされていない。本研究では、鶏胚を用いて血球血管芽細胞の血管内皮への形態学的な分化過程について解析した。【材料と方法】胎生 4- 4 1/2 日 (HH stage 23~24) の鶏胚をザンボニン固定液にて固定後、パラフィン切片を作成しヘマトキシリン・エオジン染色を施した。電顕用試料は Karnovsky's 液で固定後、エポキシ樹脂に包埋し薄切切片をトルイジンブルー染色後、LM 観察, ならびに超薄切片を TEM 観察した。次に抗 CD31, FLK-1 抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。【結果および考察】大小の血管腔内や心臓腔内には、円盤状や正円形をした様々な分化過程の血球血管芽細胞様の集塊が観察された。内皮細胞へ分化する血球血管芽細胞は細胞質が膨化し、粗面小胞体やゴルジ装置が発達していた。血管内皮に近接する細胞はバルーン状やドーム状の構造を示し、さらに三日月状を呈した細胞は血管内皮に接着していた。これらの細部膜上には抗 FLK-1, CD31 抗体の陽性反応が観察されることから、血管内皮前駆細胞と推測された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

A putative mechanism of vasculogenesis estimated from morphological analysis of the chick embryo

○Hara Y¹, Inoue K², Sato T¹

¹Dept Anat Histocytol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Inst Electron Microscopy, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Purpose: Blood vessels are formed de novo (vasculogenesis) and from the sprouting of capillaries from preexisting vessels (angiogenesis). Both mechanisms might establish the rapid development of the blood circulating system during the embryonic period. However, a detailed mechanism of vasculogenesis remains to be not clarified. In this study, we have analyzed minutely the morphogenesis of differentiated hemangioblasts at light- and electron- microscopic levels. **Materials & Methods:** Chick embryos, 4 - 4 1/2 days (HH stages: 23-24) were used for this study. Samples were fixed with Zamboni's or Karnovsky's fixative solution for a light microscopy and for electron microscopic analysis, respectively. Semi-thin serial sections were stained with toluidine blue. Moreover, we have conducted immunohistochemical analysis using anti-CD31 or anti-FLK1 antibodies. **Results & Conclusion:** Various differentiated precursor cells from hemangioblasts into endothelial cells were confirmed in the blood vessels, sinusoid and endocardium at electron-microscopic levels. These cells appeared to be balloon-shaped, adhering on the luminal surface of vascular walls. Some of these cells were labeled with anti-FLK1 or CD31. The present results suggest that some hemangioblasts derived from the extra-embryonic yolk sac might be differentiated into both hematopoietic and vascular endothelial cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C12 細胞外マトリックスタンパクフィブリン7とそのC末端フラグメントタンパクによる新しい血管関連疾患治療の可能性—フィブリン7の *in vivo* における血管新生抑制活性—

○池内 友子¹, Forcinito Patricia¹, de Vega Susana², Amaral Juan³, Rodriguez Ignacio³,
平澤 (有川) 恵理², 山田 吉彦¹

¹米国立衛生研 歯科・頭蓋顔面研

²順天堂大 院医 老人性疾患病態治療研究セ

³米国立衛生研 眼研

悪性腫瘍, 加齢黄斑変性症などの疾患は血管新生による病態の重症化が知られている. その治療標的として血管新生の抑制が注目されるが, 正常血管を維持したまま病的な血管新生を選択的に抑制することは難しく, 急激な血管新生抑制活性による正常血管の機能阻害が副作用として更なる病態の悪化を招くこともある. 我々は無血管組織である軟骨, 角膜などに発現する細胞外マトリックスに血管新生抑制活性があると仮説をたて, フィブリン7 (Fbln7) がそれらの組織に共通して発現していることを見いだした. Fbln7 は我々の研究室がマウス白歯の cDNA ライブラリーから同定した Fbln ファミリー分子のひとつであり, 我々は Fbln7 の C 末端フラグメントタンパク (Fbln7-C) が *in vitro* でヒト臍帯静脈内皮細胞のチューブ形成抑制活性があることを明らかにした. 本研究では *in vivo* における Fbln7 の血管新生抑制活性の検討を目的とし, ラットの眼を使った血管新生評価モデルを用いて解析した. 血管新生を誘導する7-ケトコレステロールとフルレングス Fbln7 (Fbln7-FL) または Fbln7-C を混合したインプラントを作製し, 手術でラットの角膜下に挿入した後, 7, 10 日後に蛍光色素を血管へ投与しインプラントへの血管新生領域を検証した. その結果, コントロール群に比べ Fbln7-FL と Fbln7-C を混合したインプラントでは血管新生領域は大きく減少していた. Fbln7-C による血管新生抑制メカニズムを解析したところ, Fbln7-C は血管内皮細胞増殖因子受容体 2 (VEGFR2) と結合し, VEGFR2 の下流シグナルを阻害することが示唆された. 病的な新生血管では VEGFR2 の発現が増強することが報告されており, Fbln7-FL と Fbln7-C には病的な新生血管を選択的に抑制する血管関連疾患治療の新しい可能性が期待される.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Anti-angiogenic activity of the extracellular matrix protein fibulin-7 and its C-terminal fragment *in vivo*

○Ikeuchi T¹, Forcinito P¹, de Vega S², Amaral J³, Rodriguez I³, Hirasawa E², Yamada Y¹

¹Mol Biol Sec, Lab Cell and Dev Biol, NIDCR, NIH

²Res Inst for Disease of Old Age, Juntendo Univ Grad Sch Med

³Lab of Retinal Cell and Mol Biol NEI, NIH, Bethesda, MD, USA

Many angiogenesis-related diseases, such as cancer and age-related macular degenerative disease (AMD) cause considerable morbidity and mortality. There is a need to find a highly efficient anti-angiogenic therapeutic with few side effects. Fibulin-7 (Fbln7) is a newly discovered member of the fibulin extracellular matrix (ECM) protein family that serves as a cell adhesion molecule and interacts with ECM molecules, receptors, and growth factors. Fbln7 is also expressed in the cartilage and blood vessels. Using a recombinant protein approach, we previously showed that the C-terminal Fbln7 fragment (Fbln7-C) inhibits tube formation by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in cultures. In this study, we examined the anti-angiogenic activity of full-length Fbln7 (Fbln7-FL) and Fbln7-C *in vivo*, using a rat corneal model. We prepared three types of biodegradable implants. Each of the implants contained a combination of the pro-angiogenic lipid 7-ketocholesterol (7KCh) and Fbln7-FL or Fbln7-C. Relative to the control, both Fbln7-FL and Fbln7-C implants inhibited neovascularization. We are also studying the mechanism of the anti-angiogenic activity of Fbln7-C. We have found that Fbln7-C binds to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and inhibits VEGF signaling. Our results suggest that Fbln7-C is a potential therapeutic compound for diseases associated with angiogenesis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C13 過酸化水素による歯肉由来線維芽細胞と三次元歯肉モデルの酸化障害に対する水素水の防御効果

○肖 黎¹, 三羽信比古²

¹日歯大 生命歯 薬理

²県立広島大

【目的】本研究の目的は、酸化ストレスによる口腔細胞および組織の障害に対する抗酸化水素水の防御効果を調べることである。【方法】水素水はマグネシウム水素水スティックと超純水との反応により生成された（溶存水素濃度約 1.5 ppm）。溶液抗酸化力の検定は ORAC 法で行われた。細胞生存率と増殖率は LIVE/DEAD 染色法および PrestoBlue 法によって検定された。細胞内及び組織内活性酸素の検出は CellROX Reagents (Thermo Fisher Scientific) を用いて行われた。細胞遊走能は創傷治癒アッセイ (wound healing assay) で検定された。【結果と考察】ORAC 法で水素水処理後のヒト歯肉由来線維芽細胞 (HGF 細胞) の抗酸化力を検定したところ、水素水の処理により HGF 細胞の抗酸化能が有意に上昇した。また、水素水は酸化発生剤である過酸化水素と cumene hydroperoxide による HGF 細胞および三次元歯肉モデルにおける活性酸素の発生を抑制したことが分かった。PrestoBlue 法および LIVE/DEAD 細胞死検定法で HGF 細胞生存率を調べた結果、水素水前処理により、過酸化水素による HGF 細胞死および増殖停止が抑制された。さらに、創傷治癒アッセイ (wound healing assay) で水素水における HGF 細胞遊走能への影響を検証した結果、水素水は創傷部位への HGF 細胞の遊走を促進することが分かった。これらの結果によると、水素水は酸化ストレスから口腔細胞と組織を防御する能力があることが証明された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Protective effects of hydrogen-rich water on free radical initiators-induced oxidative stress injuries in three-dimensional gingival tissue equivalents

○Xiao L¹, Miwa N²

¹Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

²Prefec Univ of Hiroshima

In this study, the effects of hydrogen-rich water (HW) on reactive oxygen species (ROS)-induced cellular damage in human oral cells and reconstructed three-dimensional gingival tissue equivalents were assessed. HW was prepared with a magnesium stick in 600-ml double distilled water (DDW). The dissolved hydrogen in the solution was about 1.5 ppm, in contrast to 1.6 ppm for the maximum concentration in normal temperatures and pressures. Using ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay, we demonstrated that HW could increase intracellular antioxidant capacity. HW also significantly decreases hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-induced reactive oxygen species (ROS) generation in both human gingival fibroblasts (HGF) and three-dimensional gingival tissue equivalents. Cell viability assays showed that HW-administration significantly decreases hydrogen peroxide-induced cell death and proliferation suspension in HGF cells. Additionally, *in vitro* scratch assay showed that HW is able to promote wound healing in HGF cell monolayer sheets. In conclusion, HW acted like a free radical scavenger which might increase intracellular antioxidant ability and prevent free radical initiators-induced diverse harmful effects in human oral cells and tissues. Acknowledgements: The present study was supported in part by a Grant-in-Aid for AntiAging Scientific Research #1517 by Japanese Center for AntiAging MedSciences, Hiroshima, Japan to XL.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C14 ヒト乳歯幹細胞におけるビリルビン添加による細胞生存への影響

○友田恵利佳^{1,2}, 山座 孝義¹, 山座 治義², 田中 陽介¹, 園田聡一朗¹, 野中 和明²,
久木田敏夫¹

¹九大 院歯 分子口腔解剖

²九大 院歯 小児口腔

【目的】先天性胆道閉鎖症の患児では、緑色歯や歯の発生遅延が臨床的に認められる。これらは、先天性胆道閉鎖症に伴う高ビリルビン血症が象牙芽細胞の機能を障害することが原因と考えられる。我々は、象牙芽細胞の幹細胞である乳歯幹細胞において、ビリルビンが象牙質の形成を障害する事を、過去の歯科基礎医学会で報告した。今回、我々は、ビリルビンによる乳歯幹細胞の細胞死に与える影響について *in vitro* での検討を行った。**【方法】**ビリルビンを添加した培地にて、健常乳歯より単離した乳歯幹細胞を培養し、細胞の生存率、細胞死、細胞内シグナルの解析を行った。**【結果】**ビリルビン刺激乳歯幹細胞群では、ビリルビン非刺激乳歯幹細胞群と比較して細胞の生存が著しく低下していた。この細胞生存数の低下は、Annexin-V 陽性 7AAD 陽性細胞ならびに TUNEL 陽性細胞の増加と正に関係していた。また、ビリルビン刺激群では、Erk1/2 ならびに Akt のリン酸化が減少し、NF- κ B のリン酸化は上昇していた。次に、ビリルビン刺激を中断し、正常培地で培養した。この場合、細胞死を示す Annexin-V 陽性 7AAD 陽性細胞ならびに TUNEL 陽性細胞は減少し、また、ビリルビン刺激による細胞内シグナルのリン酸化異常も正常状態と同等のレベルに回復した。**【考察】**以上の結果より、ビリルビンは、乳歯幹細胞に対し Erk, Akt の経路を抑制し、NF- κ B の経路を活性化することで細胞死を誘導することが示唆された。また、ビリルビンの刺激は可逆的なものであることも示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Bilirubin induces cell death of human deciduous teeth-derived stem cells

○Tomoda E^{1,2}, Yamaza T¹, Yamaza H², Tanaka Y¹, Sonoda S¹, Nonaka K², Kukita T¹

¹Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Pediatr Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Purpose: Pediatric patients with biliary atresia express green pigmentation of deciduous teeth and dentin hypoplasia, because the hyperbilirubin impairs dentin formation in deciduous teeth. We reported that bilirubin impairs the odontogenic function of stem cells of odontoblasts, deciduous teeth-derived stem cells.

Methods: In this study, we examined whether bilirubin impairs survival of deciduous teeth-derived stem cells. **Results:** Bilirubin stimulation reduced the cell viability of deciduous teeth-derived stem cells and increased the number of Annexin-V- and 7AAD-double positive cells and TUNEL positive cells. Bilirubin downregulated phosphorylation of Erk1/2 and Akt and upregulated phosphorylation of NF- κ B in deciduous teeth-derived stem cells. When the bilirubin stimulation was broken, the enhanced cell death and altered cell signaling in deciduous teeth-derived stem cells were recovered similar status to healthy deciduous teeth-derived stem cells. **Conclusion:** These findings indicate that bilirubin induced cell death of deciduous teeth-derived stem cells via alternation of Erk1/2, Akt and NF- κ B and also suggest that bilirubin exhibits reversible effects on deciduous teeth-derived stem cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C15 高齢者の輪状甲状関節に関する組織学的研究

○阿部 伸一, 松永 智, 山本 将仁, 北村 啓
東歯大 解剖

【目的】輪状甲状関節は関節包を持ち、その周囲を靭帯が補強する構造の滑膜性の関節である。これまで高齢者の摂食嚥下機能、発音機能に重要な役割を担う輪状甲状関節に関し、その加齢変化については報告も少なく不明な点があった。そこで本研究では、高齢者の輪状甲状関節の形態的特徴を明らかにする目的で、関節包靭帯と滑膜組織の組織学的観察を試みた。【方法】試料として、東京歯科大学に献体された15体の解剖体を用いた。それぞれの解剖体から、輪状甲状関節とその周囲の構造物を含めた組織片を採取し、組織学的な観察としてHE染色、Elastin-Masson染色、免疫組織化学的染色を行った。【結果】関節軟骨表面においては粗く薄いといった退行性の変化が観察された。靭帯には一貫して豊富なエラスチン線維が含まれており、その線維は後方・下方では網目様構造なのに対して、前方・上方では長く直線的な傾向が観察された。また輪状甲状関節では、長く厚みのある滑膜ヒダを認めることができ、この中には断片化した弾性線維が含まれていた。さらには免疫組織化学的染色結果から、滑膜組織にはCD68陽性マクロファージが豊富に存在する部位が観察された。しかしながら、CD3陽性Tリンパ球は滑膜組織には観察されなかった。【考察】今回の観察結果から、高齢者の輪状甲状関節には、豊富にエラスチン線維が存在していたことが明らかとなり、高齢者が高い発音を行う時にそれらの組織が関節表面間の適合不足を補うことで、関節の前方滑走や回転運動を維持している可能性が考えられた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The cricothyroid joint in elderly Japanese individuals

○Abe S, Matsunaga S, Yamamoto M, Kitamura K

Dept Anat, Tokyo Dent Coll

Using 15 specimens of the cricothyroid joint (CT joint) obtained from donated cadavers of elderly individuals, we examined the morphologies of the ceratocricoid ligaments as well as the synovial tissue. The ligaments consistently contained abundant elastic fibers: the fibers tended to be straight on the anterior side in contrast to a mesh-like arrangement on the posterior side. Thick and/or long synovial folds were often evident in the CT joint. The synovial tissue usually contained CD68-positive macrophages, but the positive cells were often restricted to certain parts of the tissue. Factor VIII-positive capillaries were present but a few in number, and CD3- or IgM-positive lymphocytes were absent in the synovial tissue. Degenerative changes in the joint cartilage, such as roughness or thinning, were often present, but no cartilage defects were evident. Therefore, in contrast to small, non-weight-bearing joints of the musculoskeletal system, we considered the degeneration of the CT joint to be a specific, silent form of osteoarthritis. For high-pitched phonation, the CT joint in elderly individuals seemed to maintain its anterior gliding and rotation with the aid of elastic fiber-rich tissues compensating for the loss of congruity between the joint cartilage surfaces.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C16 ヒト舌静脈に関する肉眼解剖学的研究

○関 伸一郎¹, 春原 正隆¹, 三輪 容子¹, 馬場 麻人², 北村清一郎³, 佐藤 巖¹

¹日歯大 生命歯 解剖 1

²徳大 院医歯薬 顎顔面形態

³森ノ宮医療大 保健医療 理学療法

【目的】我々はこれまで口腔底における動脈の走行経路を詳細に調べてきた。一方、口腔底における静脈の走行経路を詳細に調べた報告はほとんどなく、成書の記述も、一般的な記載にとどまっている。また、インプラントなどの口腔外科処置において、口腔底における静脈性の出血事故の報告がある。口腔底における血管形成の理解および出血事故予防の観点から、本研究では口腔底における静脈の走行経路に関して肉眼解剖学的調査を進めていくことを目的とした。**【方法】**解剖学実習用日本人遺体 59 体 100 側を用いて、口腔底の静脈および周囲の構造を肉眼解剖学的手法で剖出した。**【結果と考察】**口腔底における静脈は、周囲の構造物との位置関係から 5 種に分類された。すなわち、舌骨舌筋の外側にあつて舌下神経に伴行するもの (64 側)、舌骨舌筋の外側にあつて舌神経に伴行するもの (52 側)、舌骨舌筋の内側にあつて舌動脈に伴行するもの (40 側)、顎舌骨筋を貫いてオトガイ下静脈に流入するもの (31 側)、舌骨舌筋と顎舌骨筋の間に位置し顎下腺突起に伴行あるいは流入するもの (25 側) が認められ、これらの組み合わせにより、口腔底の静脈の分布が表現できた。これらの結果と先行研究での舌下動脈や舌動脈の走行分類に基づき、口腔底における血管系の走行様式の類型が示唆できると思われる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Gloss anatomical study on the human lingual vein

○Seki S¹, Sunohara M¹, Miwa Y¹, Baba O², Kitamura S³, Sato I¹

¹Dept Anat, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

²Dept Maxillofac Anat, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

³Fac Health Sci, Morinomiya Univ of Med Sci

Purpose: We have investigated the arterial pathway in the floor of mouth. On the other hand, there are few reports on the detailed pathway of veins in this area, only described in a normalized way in general textbooks. Clinically, in dental surgery, accidents such as airway obstruction due to venous hemorrhage have been reported. With aims of understanding blood vessel formation and preventing the hemorrhage, this study was conducted. **Materials & Methods:** Using 59 bodies, 100 sides of cadavers for anatomical practices, veins in the floor of mouth and the structures around them were investigated gloss anatomically. **Results & Conclusion:** Veins in the floor of mouth were classified into five types by the relations to the surrounding structures: veins accompanying the hypoglossal nerve (64 sides); accompanying the lingual nerve (52 sides); accompanying the lingual artery (40 sides); draining into the submental veins (31 sides); accompanying or draining into the process of the submandibular gland (25 sides). The distribution patterns of veins in the floor of mouth were described by the combination of these five types of veins. Based upon these results and our previous arterial studies, the essential pathway of blood vessels in the floor of mouth might be suggested.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C17 マイクロ X 線 CT を用いた上顎小臼歯の髓室部における加齢的变化

○浅見 瑠璃¹, 網干 博文², 岩脇 淳志¹, 大高 祐聖³, 田中 晃伸⁴, 坂 英樹^{1,5}

¹明海大 歯 歯法医

²日大 歯 法医

³明海大 歯 放射線

⁴タナカ歯科

⁵明海大 歯 歯法医セ

【目的】 加齢に伴い歯では内外部において様々な変化が現れる。中でも歯の内部構造における加齢変化については、これまでパノラマ X 線写真やデンタル X 線写真、歯科用 CBCT 等を用いて、歯髓腔や根管幅径を観察した研究は多く行われているが、三次元でかつ髓室部のみに着目した報告は少ない。

そこで本研究は、抜去時年齢の明らかな歯を非破壊的な方法で歯髓腔の形態を得て、中でも髓室部に注目してその加齢的变化を観察した。

【方法】 試料は歯質欠損、う蝕、補綴処置および歯根吸収の認められない抜去時年齢の明らかな 10 代~70 代の上顎小臼歯を使用した。

各年代の抜去歯を非破壊的に、かつ高感度で任意の視点から解析することができるマイクロ X 線 CT (R_mCT, Rigaku) を用いて撮影を行い、これによって得られる raw data をもとに三次元立体構築ソフト (ZedView, LEXI) により再構築を行った。

歯および歯髓腔の形態を再現するために、閾値を設定し 2 値化した断層画像を元に立体構築画像を作製し、得られたデータより髓室部の変化を観察した。

【結果と考察】 年代別で比較すると、若干の差はみられたが加齢による明らかな変化は認められなかった。また髓室角部の角度計測を行ったところ、すべての年代において頬舌側髓室角を比較すると頬側より舌側の方が鈍角を示した。これは、上顎舌側咬頭が機能咬頭であるため食物を噛み砕く、磨り潰すといった咀嚼運動に大きく関与する。従って舌側は頬側と比較すると外部所見では咬耗が、内部所見では第二象牙質の添加が顕著である。これらのことより舌側髓室角部においては、より鈍角になったと考えられた。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Age-related of pulp chamber in maxillary premolar using micro-computed tomography

○Asami R¹, Aboshi H², Iwawaki A¹, Otaka Y³, Tanaka A⁴, Saka H^{1,5}

¹Div Forensic Odontol, Meikai Univ Sch Dent

²Dept Leg Med, Nihon Univ Sch Dent

³Div Dent Radiol, Meikai Univ Sch Dent

⁴Tanaka Dental Clinic

⁵Forensic Odontol Center, Meikai Univ Sch Dent

It was appeared various changes in the internal and external in tooth with age. So far, the reports about the age-related changes in the internal structure of the tooth have been carried out a lot. They almost observed the pulp cavity and root canal width using panoramic X-rays, dental X-rays, and Cone Beam Computed Tomography etc. However, the report of three-dimensional observation and besides it focused on the pulp chamber is few.

In this study, we used teeth that know the age at the time of tooth extraction. Then it took using a micro-computed tomography, which can be analyzed from arbitrary viewpoint with high sensitivity and non-destructive. In addition, a form of the pulp cavity obtained by three-dimensional construction software, we observed age-related changes in the pulp chamber.

The results compared with each age, slight differences were observed, but was no obvious change with age. When in all ages comparing the buccal and lingual pulp horn, lingual pulp horn showed obtuse angle. This is considered the maxillary lingual cusp is a functional cusp.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C18 災害時の身元確認作業を想定した研修会プログラムの構築と実施

○山田 良広

神歯大 院歯 災害医療歯・法医歯

災害時の歯科医療として、歯科医師に歯科治療以外で求められるのが、口腔内所見による身元確認作業である。救急時の歯科治療は暫間的な処置が多いとはいえ、普段の臨床の延長上にあるものであるが、身元確認作業は歯科医師にとっては日常臨床とは、かけ離れた作業である。東日本大震災における身元確認作業は多くの開業歯科医師により行われた。作業に従事した歯科医師からは、「はじめてみるご遺体に何もできなかった。」「すべきことはわかっているがはじめて行うので勝手がわからなかった。」などの感想を耳にした。従来、開業歯科医を対象とした身元確認作業の研修会は、地域歯科医師会主催で大学の歯科法医学者を招聘し座学を中心に行われ、実習としてはほとんどの研修会で遺体の口腔内写真を用いたデンタルチャート(DC)の記載を座学で行うことのみであった。現場で即戦力として活動するためにはより現場での作業に近い状況で実習を行う必要があった。理想はご遺体から所見を採取することであるが、さまざまな問題があり困難である。そのような状況で現場に近い環境で実習を行うためには遺体様歯科マネキンは不可欠であった。我々は検視作業に従事した経験から遺体様歯科マネキンの設計を行い、実際の研修会で用いている。具体的には、マネキンから口腔内所見の採取・口腔内エックス線撮影・口腔内写真撮影を行った後、死後のDCを作成、生前の歯科診療録とエックス線フィルムから生前のDC作成、最後に生前死後のDCを比較対照することで同一人性の鑑定を実習として行い、さらに、身元確認作業のためのDNA鑑定の意義についての講義を組み込んだ効率的な研修会のプログラムを構築した。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Planning and carry out the program of the training seminar for dental identification at the mass disaster

○Yamada Y

Dept Disaster Relief Med/Dent Div Forensic, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

In the event of a natural disaster, it is important to have staff that are well trained in various aspects of dental identification. A number of forensic dentists are now registered at universities in Japan, and dental associations often call on practical dentists to engage in field work as volunteers. Many of these dentists may not necessarily have much experience, but need to establish a scientific basis for their decisions when practicing as forensic experts in areas devastated by natural disasters. Although practicing dentists have performed admirably using their basic dental training when called upon to help in forensic cases, the work was unfamiliar to many of the newcomers, and they found it difficult to adapt to the unfamiliar environment. We planned a program for an effective workshop by constructing a mannequin to represent victim remains, and tried to recreate an environment that closely resembled actual working conditions in the field. The reliability of a dentist's scientific opinion is paramount. Personal experience and training as well as independent verification from forensic colleagues on a team basis is the best approach. Furthermore, it is important to apply DNA analysis positively, independent of dental findings, to achieve more effective identification.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C19 携帯型 X 線発生装置撮影時の防護に関する研究

○岩脇 淳志¹, 大高 祐聖², 浅見 瑠璃¹, 田中 晃伸³, 坂 英樹^{1,4}

¹明海大 歯 病態診断治療 歯法医

²明海大 歯 病態診断治療 放射線

³タナカ歯科

⁴明海大 歯 歯法医セ

【目的】近年、東日本大震災や熊本大地震など大規模災害が多く発生している。大規模災害時では多数の犠牲者が予想され、個人識別の必要性が認識されている。歯科的個人識別において X 線写真は大きな効果を発揮しているが、災害時では常時 X 線発生装置に電源を確保できないため充電して使用時に駆動できるポータブル(携帯型)X 線発生装置が多く使用される。しかし、ポータブル X 線発生装置の術者や周囲作業者の被曝管理に関する報告は少ない。今回、術者と周囲作業者の被曝線量を計測、防護について考察を行ったので報告する。【材料と方法】 現在現場で多く使用される携帯型 X 線発生装置を実験材料として使用した。ファントムとして CT 線量測定用頭部ファントムを用い、空間線量の測定を 350 cc 電離箱(Pitman 社)を用いた。空間線量測定は、コーン先端をファントムの側面に接し、床面から 1 m の高さに中心を設置した。床と平行な面と垂直な面で、中心から半径 0.5 m と 1 m の距離にて X 線主線方向を 0°としてそれぞれ 15°間隔で空間線量を 360°測定した。【結果と考察】 線量として 0°方向が最も線量が高く、次いで側方、後方の順で低い値となった。本研究の結果から、撮影者はもちろん周囲作業員も主線方向の位置ではなく側方で作業することで被曝線量を軽減できることが示唆された。しかし、大規模災害の現場においては多くの枚数撮影することが予想されるため、ポータブル X 線発生装置を使用する際は、使用現場を管理区域として設定し、個人被曝線量計による X 線作業員の被曝線量管理と鉛製の防護エプロンなどで術者だけでなく周囲作業員も防護を行う必要性がある。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The study of protection of the portable intraoral X-ray unit

○Iwawaki A¹, Ootaka Y², Asami R¹, Tanaka A³, Saka H^{1,4}

¹Div Forensic Odontol, Dept Diagn Ther Sci, Meikai Univ Sch Dent

²Div Dent Radiol, Dept Diagn Ther Sci, Meikai Univ Sch Dent

³Tanaka Dental Clinic

⁴Forensic Odontol Center, Meikai Univ Sch Dent

This study was aimed at investigating exposure dose of workers and the neighborhood workers. The output radiations generated from the portable intraoral X-ray unit, were measured using ThinX RAD (RaySafe). The stray radiations, generated from an IEC CT head phantom (a PMMA cylinder with diameter of 16 cm and height of 15 cm) and the X-ray unit, were measured using Pitman 37D and ionization chamber of 350 cc (Pitman). Large number of radiographs for victim identification work might be taken per a day as a result of large-scale disasters, it should be used for all portable intraoral X-ray units to keep the limits of occupational and public doses, setting control area for radiation protection and, making a large distance from the radiation sources, wearing a lead apron or using a protection board.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C20 肺炎球菌の菌体表層タンパク PfbA は宿主の自然免疫機構からの回避に寄与する

○山口 雅也, 広瀬雄二郎, 後藤 花奈, 住友 倫子, 中田 匡宣, 川端 重忠

阪大 院菌 口腔細菌

肺炎球菌は mitis 群レンサ球菌に属するグラム陽性細菌で、市中肺炎の主たる原因菌として知られている。肺炎球菌による肺炎では、感染局所に多量の好中球が流入する。しかし、肺炎球菌はしばしば好中球による貪食を逃れ、肺炎に引き続く侵襲性疾患を引き起こす。本研究では、肺炎球菌の菌体表層に局在するタンパクである PfbA に着目し、自然免疫回避に果たす役割を解析した。

ゲノムデータベースを利用した BLAST 検索から、PfbA は肺炎球菌間において高く保存されている一方で、他のレンサ球菌には存在しないことが示された。PfbA が好中球による殺菌回避に寄与するかを調べるため、肺炎球菌野生株もしくは *pfbA* 遺伝子欠失株とヒト好中球を混和し、培養後の菌体生存率を比較した。その結果、*pfbA* の欠失により菌の生存率が有意に低下することが示された。タイムラプス顕微鏡による観察では、*pfbA* 欠失株が好中球と混和後 1 分以内に貪食されたのに対し、野生株は 5 分以上が経過した後も貪食されなかった。次に、組換え PfbA を固相化した蛍光マイクロビーズまたは非固相化ビーズを好中球と混和した後に、細胞の蛍光強度の変化を測定することで各ビーズに対する貪食能を比較した。非固相化ビーズと比較して、PfbA 固相化ビーズが好中球に取り込まれる割合は低かった。また、好中球に TLR2/4 阻害ペプチドを作用させた場合、コントロール群と比較して、*pfbA* 欠失株の生存率はおよそ 2 倍に上昇した。一方、野生株の生存率に有意な変化は認められなかったことから、PfbA が TLR による異物の認識を阻害する可能性が示された。さらに、マウスに肺炎球菌を経気道感染し、感染 24 時間後の肺胞洗浄液中の菌数を比較した。*pfbA* 欠失株を感染させたマウスでは、野生株感染マウスと比較して、肺胞洗浄液中の菌数がおよそ 5 分の 1 まで低下した。

これらの結果から、PfbA は好中球の貪食を抑制し、肺炎球菌の自然免疫回避に寄与することが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

PfbA of *Streptococcus pneumoniae* contributes to the evasion from host innate immunity

○Yamaguchi M, Hirose Y, Goto K, Sumitomo T, Nakata M, Kawabata S

Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Streptococcus pneumoniae is the most common cause of community-acquired pneumonia. Pneumococcal pneumonia causes neutrophil migration at the site of infection, while *S. pneumoniae* often evades neutrophil-killing. In this study, we investigated the functions of PfbA against host innate immunity.

BLAST search showed that *pfbA* is highly conserved among pneumococcal strains, whereas other streptococci do not contain the gene. Neutrophil bactericidal assays demonstrated that the survival rate of the Δ *pfbA* mutant was significantly reduced as compared to the wild-type strain ($P < 0.005$). In addition, time-lapse microscopic analysis showed that neutrophils phagocytosed the Δ *pfbA* mutant strain within 1 minute, whereas they were unable to capture the wild-type strain over a 5-minute period. Flow cytometric analysis revealed that fewer PfbA-coated beads were taken up by neutrophils as compared to non-coated beads. Furthermore, TLR2/4 inhibitor peptide significantly enhanced the survival rate of Δ *pfbA* strain incubated with neutrophils as compared to the wild-type strain ($P < 0.005$). Finally, CD-1 mice were infected intratracheally with *S. pneumoniae*. At 24 hours after infection, wild-type strain showed ~5-fold higher CFU in bronchial lavage fluid as compared to the Δ *pfbA* strain. These results indicated that PfbA contributes to the evasion from host innate immunity via inhibiting neutrophil phagocytosis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C21 C1q との相互作用を介する化膿レンサ球菌の補体免疫回避機構

○小川真理子, 住友 倫子, 毛利 泰士, 山口 雅也, 中田 匡宣, 川端 重忠
阪大 院菌 口腔細菌

化膿レンサ球菌は、補体免疫系からの回避に関与する様々な因子を産生する。しかし、補体古典系路の開始因子である C1q と作用する菌体分子は明らかにされていない。本研究では、C1q との親和性を認めた endopeptidase O (PepO) に着目し、PepO と C1q の相互作用を解析するとともに、血清中での菌体生存および病原性への影響を検討した。

種々の臨床分離株における PepO の産生を Western blot 法にて確認した結果、PepO の発現は供試した 20 株全ての菌株の細胞質、細胞壁、および培養上清画分に検出された。また、PepO 組換えタンパク質 (rPepO) はヒト C1q と濃度依存的に結合することが、ELISA および分子間相互作用解析により明らかになった。続いて、rPepO と C1q の相互作用に対する NaCl 濃度および pH の影響を ELISA により解析したところ、生理条件以上の NaCl を含有する環境では、rPepO と C1q の結合が抑制された。そして pH が 6.0 以下の条件において、rPepO と C1q は有意に高い結合性を示した。pH 5.0 の条件下にてヒト血清と野生株および *pepO* 欠失株 ($\Delta pepO$) を反応させたところ、血清中における $\Delta pepO$ の菌数増加率は野生株と比較して低下した。同条件下でヒト血清と反応させた菌体の表層構造の変化を走査型電子顕微鏡で観察した結果、 $\Delta pepO$ では野生株と比較して著明な表層構造の破壊が認められた。さらに、マウス皮膚感染モデルを用いて $\Delta pepO$ の病原性への関与を検討した結果、 $\Delta pepO$ 感染による皮膚病巣サイズは野生株感染と比較して有意に小さくなった。

以上の結果より、化膿レンサ球菌は炎症病巣において PepO と C1q の結合により補体古典経路を阻害し、後期補体経路における溶菌を回避する可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Streptococcus pyogenes-produced endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q

○Ogawa M, Sumitomo T, Mori Y, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S

Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Streptococcus pyogenes expresses various virulence factors for evasion from complement-mediated bacteriolysis. However, *S. pyogenes* molecules that interact with complement C1q, an initiator of the classical pathway, remain unknown. In this study, we identified the interaction between *S. pyogenes* PepO and C1q, and examined the effect of PepO on complement pathway.

Enzyme-linked immunosorbent assay and surface resonance plasmon measurement revealed that *S. pyogenes* recombinant PepO (rPepO) bound to human C1q in a concentration-dependent manner. As it is known that pH levels are decreased in inflamed sites, the effect of PepO on evasion from complement immunity and on its virulence *in vivo* was analyzed under low pH condition. PepO exhibited higher affinity for C1q under lower pH condition. A *pepO* deletion rendered *S. pyogenes* more susceptible to bacteriocidal activity of human serum. It was also exemplified by scanning electron microscope observations that *pepO* mutant strain ($\Delta pepO$) showed damaged irregular surface morphology as compared to wild type strain (WT). In mice skin infection model, WT formed significantly larger lesions than $\Delta pepO$.

Our results suggested that the interaction of *S. pyogenes* PepO with human C1q impeded the complement pathway and consequently enabled *S. pyogenes* evasion complement-mediated bacteriolysis at inflammatory locus.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C22 インフルエンザウイルス感染に伴い上皮表層に誘導される GP96 は化膿レンサ球菌の上皮細胞への付着を亢進させる

○住友 倫子, 中田 匡宣, 毛利 泰士, 小川真理子, 山口 雅也, 川端 重忠

阪大 院歯 口腔細菌

化膿レンサ球菌は咽頭炎の起原因菌として知られているが、重症例では、軟部組織壊死や多臓器不全を伴う致死率の高い劇症型レンサ球菌感染症 (streptococcal toxic shock syndrome: STSS) を惹起する。これまでに、季節性インフルエンザの先行感染は、STSS 発症の一因であることが明らかになっている。本研究では、A 型インフルエンザウイルス (IAV) 感染に伴い細胞表層での発現が誘導される宿主分子に着目し、STSS 発症メカニズムへの関与を検討した。

ヒト肺胞上皮細胞株 (A549) に IAV A/FM/1/47 株 (H1N1) を感染させ、感染 36 時間後の細胞を免疫蛍光抗体法で観察した。その結果、IAV 感染に伴って、小胞体に局在する分子シャペロンである glycoprotein 96 (GP96) がストレスタンパクとして細胞表層へ誘導されることを確認した。

そこで、IAV 感染細胞に STSS 患者由来の化膿レンサ球菌 NIH35 株 (M28) を感染させ、感染 2 時間後における菌体付着量を検討した。IAV 感染細胞への菌体付着量はウイルス非感染細胞と比較して有意に増加したが、GP96 阻害剤の添加により非感染細胞への付着量と同等レベルまで減少した。また、化膿レンサ球菌と GP96 細胞外ドメインとの相互作用には、菌体表層タンパクである PrtF2 の N 末端領域が重要であることを ELISA で明らかにした。

以上の結果から、IAV 感染により上皮アピカル部位に表出した GP96 は、化膿レンサ球菌の菌体表層タンパクに対する宿主レセプターとして機能することにより菌体付着を亢進させることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Influenza A virus-induced surface display of GP96 promotes adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells

○Sumitomo T, Nakata M, Mori Y, Ogawa M, Yamaguchi M, Kawabata S

Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Streptococcus pyogenes causes local suppurative infections and severe invasive diseases. Recent epidemiological studies have indicated that a preceding influenza infection predisposes the host to a secondary *S. pyogenes* infection, a major cause of severe morbidity and mortality in affected individuals during influenza pandemics. It is generally accepted that virus-induced damage to the epithelial barrier provides increased adherence sites for *S. pyogenes*, leading to development of invasive disease. However, the detailed mechanism responsible for interaction between influenza virus-infected epithelial cells and *S. pyogenes* remains elusive. Here, we report that glycoprotein 96 (GP96), an endoplasmic reticulum chaperon, is exported to the apical surface of influenza A virus (IAV)-infected alveolar epithelial cells. Furthermore, *S. pyogenes* showed more efficient adherence to IAV-infected as compared to non-infected cells, while that enhanced bacterial association was reduced by a pharmacological GP96 inhibitor. Moreover, fibronectin-binding protein F2 (PrtF2) was identified as crucial for bacterial association with surface-displayed GP96. Interestingly, the N-terminal region of PrtF2, but not the fibronectin-binding domain in the C-terminus, was found responsible for interaction with GP96. Together, our results offer insight regarding the mechanism for IAV-induced redistribution of GP96 on epithelial surfaces, which plays a critical role in secondary *S. pyogenes* infection.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C23 化膿レンサ球菌の二成分制御系による nisin 耐性機構の解析

○松尾 美樹, 小松澤 均

鹿大 院医歯 口腔微生物

【目的・方法】細菌特有の二成分制御系因子 (TCS) は外環境への適応に重要な役割を担っている。本研究では *Streptococcus pyogenes* SF370 株の持つすべての TCS の不活性化株を用いて、細菌が産生する種々のバクテリオシンに対する感受性を direct 法と MIC 法で網羅的に検証した。【結果・考察】Spy_1081-82 にコードされる *srtRK* 不活性化株において、乳酸菌が産する nisin A に対する感受性の増加を認めた。*srtRK* の近隣領域にはバクテリオシン排出系 ABC トランスポーターと相同性を持つ遺伝子 *srtFEG* が存在していた。Nisin A 添加・非添加時における SF370 野生株と *srtRK* 不活性化株における *srtFEG* 発現を定量 PCR ならびに western blotting を用いて検証した結果、野生株では nisin 添加時に *srtFEG* 発現誘導が認められたが、*srtRK* 不活性化株では野生株で認められた発現誘導の消失が認められた。そこで *srtFEG* 不活性化株における nisin に対する感受性を検証した結果、*srtRK* 不活性化株同様感受性の増加が認められた。nisin 産生性乳酸菌と *S. pyogenes* の共培養時の占有生存率を検証した結果、*S. pyogenes* 野生株との共培養時に比較し、*srtRK* 不活性化株では nisin 産生菌との共培養時における占有生存率の低下を認めた。本研究から *S. pyogenes* は他菌の産生するバクテリオシンに対し TCS-ABC トランスポーターを介して耐性機構を獲得していることが明らかになった。Nisin A と同タイプのバクテリオシンである Streptin を産生する *S. pyogenes* BL-T 株は Streptin 合成遺伝子と SF370 株で保有する *srtRK*, *srtFEG* 遺伝子を持つことが報告されている。この領域の遺伝子を比較したところ、SF370 株は BL-T 株で認められるバクテリオシン生合成遺伝子の一部が欠損していることが明らかになった。しかし、SF370 株において *srtRK* を介しバクテリオシンの耐性機構は保存されていることから、バクテリオシン産生能を持たない細菌であっても耐性能は保持していることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Evaluation of resistant mechanism of two-component system against nisin A in *Streptococcus pyogenes*

○Kawada-Matsuo M, Komatsuzawa H

Dept Oral Microbiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Two-component systems (TCSs) are specific regulatory systems in bacteria that play an important role in sensing and adapting to the environment. In this study, we systematically evaluated the roles of TCSs in the resistance of *Streptococcus pyogenes* SF370 to several types of lantibiotics. In a comprehensive analysis using individual TCS mutants, the inactivation of *srtRK* (Spy_1081-82) in SF370 increased the susceptibility to nisin A (class I type AI) produced by *Lactococcus lactis* ATCC11454, while the susceptibilities of nukacin ISK1 produced by *Staphylococcus warneri* and C55 produced by *S. aureus* TY4 were not altered in all TCS mutants. The expression of *srtFEG* (Spy_1085-87), which locates downstream of *srtRK* and shows homology with ABC transporters, was increased in response to nisin A. However, *srtFEG* expression was not induced by nisin A in *srtRK* mutant. Also, inactivation of *srtFEG* increased the susceptibility to nisin A. These results conclude that the intrinsic resistance to nisin A is mediated by SrtEFG induced by SrtRK. Additional evidence suggests that SrtRK is required for co-existence with *L. lactis* ATCC11454 producing nisin A. Our results highlight the roles of nisin A in the interactions between *S. pyogenes* and the importance of TCSs in this process.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C24 *Streptococcus gordonii* DL1 による赤血球凝集活性と血小板凝集活性には Hsa の 2 つのアルギニン残基が関与する

○田代有美子, 高橋 幸裕, 古西 清司

日歯大 生命歯 微生物

【目的】 *Streptococcus gordonii* DL1 の表層タンパク質 Hsa は赤血球の膜タンパク質 glycophorin A や band3, 血小板の表層タンパク質 GPIb α に結合する. この結合はこれらの糖タンパク質に存在する α 2-3 結合のシアル酸末端に Hsa の NR2 領域が結合することで起こる. しかしながら, Hsa の NR2 領域によるシアル酸結合に関する詳細なメカニズムは未だ不明である. そこで本研究では, NR2 領域内のシアル酸との結合に必要なアミノ酸残基の特定を行った. **【方法】** GST 融合 HsaNR2 タンパク質の NR2 領域内のアルギニン残基をアスパラギン残基に置換した変異体を 7 種作製した. これらの GST 融合タンパク質を用いて赤血球凝集反応試験および血小板凝集反応試験を行った. さらに, 上記と同じ部位のアルギニン残基をアスパラギン残基に置換した Hsa をコードする遺伝子をレンサ球菌プラスミドで構築し *S. gordonii* DL1 の *hsa* 欠損株に移入させた株を作製し, 赤血球凝集反応, 血小板凝集反応, ヒト白血球との結合実験を行った. **【結果】** 作製した GST-HsaNR2 変異体タンパク質および移入変異株のうち R340 と R365 に変異を入れた変異体では赤血球凝集能および血小板凝集能が消失していた. **【考察】** これらの結果から Hsa NR2 領域内の R340 と R365 が *S. gordonii* DL1 による赤血球凝集や血小板凝集に関与していることが示唆された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Two arginine residues of *Streptococcus gordonii* Hsa are associated with bacterial hemagglutination and aggregation of platelet

○Tashiro Y, Takahashi Y, Konishi K

Dept Microbiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Objectives : Hsa is a large serine rich protein of *Streptococcus gordonii* DL1 and mediates binding to α 2-3-linked sialic acid termini of platelet glycoprotein Ib α , and erythrocyte membrane protein glycoprotein A and band3. The binding interaction appears to be mediated by an NR2 region of Hsa. However, the molecular details of the interaction between Hsa NR2 region and these glycoproteins are not well understood. In this study, we analyzed the amino-acid residues of Hsa NR2 region involved in sialic-acid recognition. **Method :** We constructed seven mutants of GST-HsaNR2, each containing a point mutation of an arginine residue. Using these GST fusion proteins, we performed hemagglutination assay and aggregation of platelet assay. Furthermore, we established *hsa* mutants of *S. gordonii* DL1 and determined the ability of *S. gordonii* DL1 *hsa* mutants to adhere to human erythrocytes and platelets. **Results :** Two of those mutants, R340N and R365N of recombinant proteins and mutant strains failed to interact with human erythrocytes and platelets. **Conclusion :** These results indicate that at least two arginine residues (R340 and R365) of Hsa are involved in the hemagglutination activity and aggregation activity of platelet of *S. gordonii* DL1.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C25 タイ児童の口腔清掃状態と唾液中のベイオネラ属細菌種の分布と出現頻度

○Theodorea Citra^{1,2}, 眞島いづみ^{1,3}, 中澤 太¹

¹北医療大 歯 微生物

²インドネシア大 歯 口腔生物

³学振 特別研究員 PD

The distribution and frequency of oral *Veillonella* species in saliva from Thai children associated with oral hygiene status

○Theodorea C^{1,2}, Mashima I^{1,3}, Nakazawa F¹

¹Div Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

²Dept Oral Biol, Fac Dent, Univ Indonesia

³Postdoc JSPS

Background: Oral hygiene has influence in the microbial profile and diversity of oral biofilms. Oral *Veillonella* species were known as early colonizer in the biofilm formation. However, the distribution and frequency of oral *Veillonella* species associated with oral hygiene status has not been clarified. **Aim:** Distribution and frequency of oral *Veillonella* species in the saliva from the Thai children associated with oral hygiene status were evaluated in this study. **Methods:** 46 subjects were classified by using *Simplified Oral Hygiene Index* (OHI-S) into three groups. PCR with species-specific primer sets were used for identification. **Results:** The total number of *Veillonella* isolates in poor OHI-S group had twice higher than that in good OHI-S group. *V. rogosae* was detected as predominant species in all groups. Otherwise, *V. denticariosi* was detected at low frequency in every group. In addition, *V. parvula* was detected in poor OHI-S group, mainly, and *V. tobetsuensis* was only detected in moderate and poor OHI-S group. **Conclusion:** Based on these results, the total number of *Veillonella* species in the saliva might have related with oral hygiene status. Moreover, the presence of *V. parvula* and *V. tobetsuensis* might have associated with deterioration of oral hygiene status in Thai children.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-C26 タイ児童舌苔から分離された *Veillonella* 属新菌種の塩基配列解析

○眞島いづみ^{1,2}, Theodora Citra², 中澤 太²

¹学振 特別研究員 PD

²北医療大 歯 微生物

【目的】*Veillonella* 属細菌は口腔バイオフィルム初期形成菌として、ヒト口腔から多く分離されることが報告されている。口腔 *Veillonella* は現在、*V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae*, *V. tobetuensis* の全 6 菌種が確立されている。これまでの研究過程で、我々は *Veillonella* 属特異的 PCR プライマー陽性で (*Veillonella* 属細菌で) あるが、上記 6 菌種の特異的プライマーでは陰性 (既存の *Veillonella* 6 菌種には分類されない) の 40 株をタイ児童舌苔から分離した。本研究ではその中の代表的 11 株の *rpo B* 遺伝子のシーケンス解析を行ったので、その結果を報告する。【材料と方法】Rogosa 選択培地にて嫌気培養した 11 株から DNA を抽出し、*Veillonella* 属特異的プライマーを用いた PCR 産物の塩基配列を、Dye Terminator 法により ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて解析した。得られた塩基配列について BLAST 検索、未同定株間及び既報菌種との類似性比較、系統樹解析を行った。【結果と考察】BLAST 検索の結果、11 株は *V. dispar* に最も近縁であったが、その塩基配列の類似性は 97 - 98% を示し、E-value は 0.0 - 4e-168 と高値であった。更に、系統樹解析において、これら 11 株は既報菌種とは全く異なるクラスターを形成し、それらの類似性は 92.4 - 100% であった。これらの結果より、これまで報告されていない *Veillonella* 属新菌種の存在が強く示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The sequence analysis of the novel *Veillonella* species isolated from tongue biofilm of Thai children

○Mashima I^{1,2}, Theodora C², Nakazawa F²

¹Postdoc JSPS

²Div Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Purpose: Oral *Veillonella* is comprised of the following species: *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae* and *V. tobetsuensis*. In our previous studies, 40 strains were isolated from tongue biofilm of Thai children as unknown *Veillonella* species. Although they made PCR products with *Veillonella* genus-specific primers, they made no PCR products or non-specific one with *Veillonella* species-specific primers. In this study, the results of sequence analysis of *rpo B* gene against 11 representative strains indicated the possibility of novel *Veillonella* species. **Materials & Methods:** PCR-based amplification and sequence analyses of *rpo B* were performed using previously described *Veillonella* genus-specific primers. The sequences were determined with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. BLAST search, pairwise similarity values and constructing phylogenetic tree were examined. **Results and Discussion:** As the results of BLAST search, the sequences of 11 strains showed 97- 98% similarities with *V. dispar*, and the high E-value between 0.0 and 4e-168. In addition, the 11 strains formed a distinct cluster from the established oral *Veillonella* species in the *rpo B* tree, and showed 92.4 - 100% inter-strain sequence similarities. These results strongly indicated the possibility of novel species in the genus *Veillonella* within the 11 strains.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D1 下歯槽神経切除後の顔面皮膚感覚機能回復に対する GDNF の有用性○渡辺 雅弘¹, 篠田 雅路², 菅野 直之¹, 佐藤 秀一¹, 岩田 幸一²¹日大 歯 保存 III²日大 歯 生理

下歯槽神経損傷によるオトガイ部皮膚の感覚鈍麻は、歯科臨床において高頻度に起こる偶発症の一つであり、治療に苦渋することが多い。グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)は軸索伸長を促進することが知られており、下歯槽神経損傷後の軸索再生に有効である可能性がある。今回われわれは下歯槽神経切除モデルを作製し、切除部位への GDNF 局所投与による下歯槽神経支配領域皮膚における機械痛覚の経時的変化および下歯槽神経の組織学的変化を解析した。全身麻酔下にて SD ラット(7w, ♂)の下歯槽神経(IAN)を約 2 mm 切除し、IAN 切除ラットを作製した。IAN 切除部位に GDNF (1.25 μM) または Vehicle (0.1M PBS) を含浸した徐放担体を埋入し、4-0 ナイロン糸にて皮膚縫合した。機械刺激装置 (Digital fon Frey) を使用し、下歯槽神経支配領域(オトガイ部皮膚)への機械刺激に対する逃避閾値(MHWT)を経日的に計測した。さらに、IAN 切除部位に GDNF を含浸した徐放担体を埋入したのち、GDNF 受容体(GFR-α1)中和抗体を連日局所投与し、同様に MHWT を経日的に計測した。IAN 切除後 3, 5 日目に IAN 切除部位を摘出し、シュワン細胞のマーカーである Glial Fibrillary Acidic Protein(GFAP)および GFR-α1 発現を免疫組織学的手法にて検索した。IAN 切除後 5 日目、切除部位への GDNF 投与により MHWT が有意に回復した。また、GFR-α1 中和抗体を連日局所投与により、その MHWT の回復が有意に抑制された。IAN 切除部位において、GFAP および GFR-α1 共陽性細胞を認めた。以上の結果から、IAN 切除部位への GDNF 投与はオトガイ部皮膚の感覚機能回復を促進することが示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。**Effect of local GDNF administration on functional recovery of facial sensation following inferior alveolar nerve transection**○Watanabe M¹, Shinoda M², Sugano N¹, Satou S¹, Iwata K²¹Dept Periodontol, Nihon Univ Sch Dent²Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

Clinically, mandibular nerve injury causes anesthesia or hypesthesia in the labiomental skin. Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) is known to promote axonal outgrowth, suggesting that GDNF administration accelerates functional recovery following nerve injury. The present study was undertaken to determine the role of GDNF in the site of nerve injury on mechanical anesthesia or hypesthesia in the labiomental skin following inferior alveolar nerve transection (IANX). The inferior alveolar nerve was transected under deep anesthesia, and GDNF (1.25 μM) was continuously administrated to the site of nerve injury using biodegradable hydrogel. We measured daily mechanical head-withdrawal threshold (MHWT) in the labiomental skin. By the same token, MHWT was measured in GDNF-administrated IANX group with GDNF receptor (GFRα1) neutralizing antibody. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP; a marker of Schwann cell) and GFRα1 expression in the site of nerve injury were also examined immunohistochemically. Local GDNF administration significantly accelerates the recovery of increased MWRT, and the recovery was significantly depressed by GFRα1 neutralizing antibody administration to the injury site. GFAP and GFRα1 immunoreactive cells were observed in the wound site. Taken together, these findings suggest that GDNF administration to the wound site is helpful in functional recovery of labiomental sensation following IANX.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D2 下歯槽神経の再生過程における細胞接着分子の発現変化

○鈴木 達郎¹, 近藤 真啓², 菅野 直之¹, 岩田 幸一², 佐藤 秀一¹

¹日大 歯 保存 III

²日大 歯 生理

歯科治療時に起こる偶発事故の一つに口腔顔面領域の神経損傷が挙げられるが、損傷神経の再生機構についてはいまだ不明な点が多い。細胞接着分子 Cadherin は、神経の発生・発達の諸過程において重要な機能を持つ分子であり、シナプス形成および神経突起伸長に作用することから、損傷神経の再生に関与することが考えられる。そこで本研究では、下歯槽神経損傷モデルマウスを用いて、感覚機能の治癒過程における Cadherin の役割について検討を加えた。

下歯槽神経損傷モデルマウスを作製し、下唇部への機械刺激に対する痛覚閾値の変化をもとに神経再生過程を機能的に評価した。また、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および三叉神経節 (TG) における E-cadherin の発現変化を免疫組織化学的に解析した。

下歯槽神経切断により機械刺激に対する感覚鈍麻は、軸索切断 2 週間後には回復傾向を示したが、4 週間後でも対照群と同程度までは回復しなかった。Naïve 群において、E-cadherin は Vc の表層に存在し、非ペプチドニューロンマーカーである IB4 と共存した。一方、TG 内では、中型から大型ニューロンおよび一部の IB4 陽性ニューロンの細胞膜周囲に強い免疫活性を示した。下歯槽神経切断 2 週間後では、Naïve 群と比べて、Vc および TG の三叉神経第 3 枝の投射領域において E-cadherin の発現が有意に減少していた。

以上の結果より、神経損傷後、機械感覚の回復時期と一致して、三叉神経脊髄路核表層および TG ニューロンにおいて E-cadherin の発現が低下していることが明らかになった。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The expression of cell adhesion molecules advancing inferior alveolar nerve regeneration

○Suzuki T¹, Kondo M², Sugano N¹, Iwata K², Sato S¹

¹Dept Periodontol, Nihon Univ Sch Dent

²Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

In dental treatment, an accidental nerve injury in the orofacial area can create complications for patients and doctors, yet the molecular mechanism of nerve regeneration is largely unknown. Cadherin, which plays a critical role in axonal targeting and synapse formation, is thought to be candidates for nerve regeneration-related molecules.

In the present study, we evaluated functional regeneration of the injured axons measuring the reflex threshold value to mechanical stimulation of the lower lip and examined the expression patterns of E-cadherin in the trigeminal subnucleus caudalis (Vc) and trigeminal ganglion (TG) after inferior alveolar nerve transection (IANX) immunohistochemically.

After axotomy, the hypoalgesia to mechanical stimulation persisted until Day 7, and on Day 14 was recovered. However, until Day 28 of observation the mechanical threshold in IANX group was not recovered completely. E-cadherin immunoreactivities (IR) were observed in the IB4-positive layer of Vc and the pericellular membranes of some TG neurons. Fourteen days after IANX, the E-cadherin-IR were significantly decreased in Vc and TG.

Our results suggest that the change of E-cadherin expression levels may be involved in the functional regeneration of damaged TG neurons.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D3 ラット TG ニューロンにおける象牙芽細胞機械刺激誘発性活動電位記録

○佐藤 正樹, 木村 麻記, 小島 佑貴, 東川明日香, 隴田みゆき, 小倉 一宏, 望月 浩幸,
河野 恭佑, 澁川 義幸, 田崎 雅和

東歯大 生理

象牙芽細胞は象牙質形成細胞であり感覚受容細胞である。象牙芽細胞は transient receptor potential (TRP) チャネルを介して様々な刺激を受容し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる。増加した細胞内 Ca^{2+} は pannexin-1 チャネルを活性化するシグナルとなって細胞外へ ATP を放出する。ATP は三叉神経節 (trigeminal ganglion: TG) ニューロンに発現するイオンチャネル型 ATP 受容体 ($P2X_3$) を活性化することで、象牙芽細胞-TG ニューロン間における感覚信号を連絡する。本研究は象牙芽細胞機械刺激によって誘発される TG ニューロンの活動電位を記録した。実験に用いた象牙芽細胞と TG ニューロンは幼若ラットから単離して共培養した。TG ニューロンは歯髄細胞と区別するために DiI で標識した。さらに三叉神経には様々な大きさの細胞体をもったニューロンが存在するため、非ペプチド作動性 C ニューロンの特異的のマーカを用いて、標識されなかった細胞体直径が 20-30 μm の TG ニューロンから記録を行った。象牙芽細胞への機械刺激はガラス微小電極を電動マニピレータで操作して直接機械刺激を行った。象牙芽細胞機械刺激によって誘発される TG ニューロンの応答は whole-cell patch clamp 法で電流と電圧を記録した。象牙芽細胞への機械刺激は TG ニューロンに内向き電流を発生させた。TG ニューロンに発現する $P2X_3$ 受容体の阻害剤、象牙芽細胞に発現する機械感受性 TRP チャネルの阻害剤と piezo-1 チャネルの阻害剤は TG ニューロンに発生する内向き電流を有意に抑制した。加えて、TG ニューロンは象牙芽細胞機械刺激によって活動電位を発生した。象牙質表面への刺激が象牙芽細胞に受容され、放出された ATP が TG ニューロンを興奮させることで象牙質痛が生じることが示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Odontoblast mechanical stimuli-induced action potential recording in rat TG neurons

○Sato M, Kimura M, Kojima Y, Higashikawa A, Shimada M, Ogura K, Mochizuki H, Kono K, Shibukawa Y, Tazaki M

Dept Physiol, Tokyo Dent Coll

Odontoblasts are dentin-forming cells and sensory receptors cells. Odontoblasts receive various stimuli by transient receptor potential (TRP) channels, and increase intracellular Ca^{2+} . Increased intracellular Ca^{2+} activates pannexin-1 and release ATP extracellularly. Released ATP then activates ionotropic ATP receptors ($P2X_3$) in trigeminal ganglion (TG) neurons, to transmit the sensory signals from odontoblasts to TG neurons. In the present study, we recorded action potentials from TG neurons in response to mechanical stimulation to odontoblasts. Odontoblasts and TG neurons were isolated from neonatal wister rats and primary co-cultured. TG neurons were labeled by DiI. Mechanical stimuli were applied using a glass micropipette filled with standard extracellular solution. When mechanical stimuli were applied to odontoblasts, evoked inward currents and action potentials from large diameter TG neurons. Antagonists for the $P2X_3$ receptor, mechano-sensitive TRP channels and piezo-1 channel significantly inhibited evoked inward currents in the TG neurons. Odontoblasts received stimulation to the dentin surface, and TG neuron excited by ATP released from odontoblasts.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D4 ウサギ咀嚼様運動中の開口反射変調は咬合挙上に適応する

○松永 知子, 森田 匠, 平場 勝成

愛院大 歯 生理

【目的】

低強度刺激により誘発される開口反射は、咀嚼運動中持続的に抑制されることが知られている。我々はこれまで麻酔動物を用いて咀嚼様運動中の低強度開口反射の下顎位及び咀嚼側の差異が開口反射変調に与える影響について観察し、咀嚼運動中の開口反射変調が一様ではないことを明らかにした。本研究では可撤式咬合挙上装置 (bite plate) を使用して咀嚼運動時の作業側の咬合高径を人工的に変化させた時に、開口反射の変調が新たな咬合高径に適応するのかについて検討を行った。

【方法】

麻酔下のウサギを用いて、大脳皮質咀嚼野電気刺激で誘発される咀嚼様運動時の顎運動と顎二腹筋の筋電図活動を記録した。咬合挙上前の閉口相中期 (hal-CL) と閉口相後期 (end-CL) 及び咬合挙上後の閉口相後期 (end-CL with BP) の3つの下顎位で下歯槽神経への低強度電気刺激により開口反射を誘発した。hal-CL と end-CL with BP は垂直的に同じ位置になるように設定した。

【結果と考察】

1. 咬合挙上前の hal-CL と end-CL の下顎位で誘発した開口反射は、end-CL の方が有意に強い抑制を受けていた。

2. 挙上前に hal-CL であった下顎位を挙上時に相対的に閉口相の後期となるように咬合調整した下顎位 (end-CL with BP) では、挙上前の hal-CL と比較して、開口反射が有意に強く抑制された。

咬合挙上前の hal-CL は、挙上後の end-CL with BP の下顎位と垂直的な開口量は同じであったにも関わらず、その抑制量は変化したことから、開口反射が強く抑制される下顎位が、咬合高径の変化に伴って新たな下顎位に適応したと考えられた。これは、矯正治療や全顎的な補綴治療などにより咬合高径を変化させたとしても開口反射の変調は新たな咬合高径に適応しうることを示唆している。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Jaw opening-reflex modulation is adapted to the bite-raising during fictive mastication in rabbits

○Matsunaga T, Morita T, Hiraba K

Div Physiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Objective: It has been reported that the low-intensity jaw-opening reflex (JOR) is the most suppressed at end of jaw-closing phase (end-CL) during fictive mastication in anesthetized rabbits. This study aimed to examine whether the JOR modulation is adapted a new vertical dimension during mastication, when the occlusal vertical dimension changed experimentally using a removal appliance.

Materials & Methods: EMG activities of the digastric muscle were simultaneously recorded with mandibular movements during masticatory-like jaw movements induced by electrical stimulation to the cortical masticatory area of anesthetized rabbits. A removable bite plate (BP) was used for artificial bite-raising. The jaw movement signal was used to deliver the stimuli to the inferior alveolar nerve for induce JOR at half of closing phase (hal-CL), end-CL and end-CL with BP.

Results & Conclusion: The JOR at end-CL was significantly suppressed compared with JOR at hal-CL without BP. The JOR at end-CL with BP was significantly suppressed compared with JOR at hal-CL without BP, despite the inter-incisal distance was vertically same. These findings that modulation of JOR during mastication adapts change of the vertical dimension. Furthermore, it is suggest that modulation of JOR depends on mandibular position during mastication not just amount of inter-incisal distance.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D5 ラット三叉神経運動核背側領域に存在する Phox2b 陽性ニューロンの電気生理学的特性

○那小屋公太^{1,2}, 中村 史朗², 中山希世美², 望月 文子², 清本 聖文², 井上 富雄²

¹昭大 歯 口腔リハ

²昭大 歯 口腔生理

【目的】 Phox2b はホメオドメインをもつ転写因子の一種で、自律神経中枢の発生に関与する。これまで三叉神経上核を含む三叉神経運動核背側領域 (RdV) に Phox2b を発現するニューロンが存在しているという報告があるが、その性質や役割については未だ不明である。そこで本研究では、Phox2b の発現制御領域下に蛍光タンパク質 (EYFP) を発現させたトランスジェニックラット (Phox2b-EYFP ラット) を用い、RdV に存在する Phox2b 陽性ニューロンの電気生理学的特性および出入力特性を解析した。**【方法】** 実験には生後 2~7 日齢の Phox2b-EYFP ラットを用いた。麻醉下にて前頭断脳幹スライス標本を作成した後、RdV に存在する Phox2b 陽性ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行った。**【結果】** RdV に存在する Phox2b 陽性ニューロンのうち、96% (53/55) が持続的に発火する性質を有しており、高頻度スパイク発射型 (5/53) と低頻度スパイク発射型 (48/53) に分類することができた。4% (2/55) は一過性に発火する性質を示した。また、三叉神経運動核の電気刺激に応答したニューロンは 7.5% (4/53)、三叉神経中脳路核の刺激に応答するものは 25.5% (14/55)、三叉神経脊髄路の刺激に応答するものは 10.3% (3/29)、三叉神経主感覚核の刺激に応答するものは 23.1% (6/26) であった。**【考察】** 以上の結果より、RdV に分布する Phox2b 陽性ニューロンの中には、三叉神経領域の感覚入力を受けるニューロンが存在し、口腔顎顔面感覚の情報処理に関与している可能性が考えられた。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Electrophysiological properties of Phox2b-positive neurons situated in the reticular formation dorsal to the trigeminal motor nucleus in rats

○Nagoya K^{1,2}, Nakamura S², Nakayama K², Mochizuki A², Kiyomoto M², Inoue T²

¹Div Oral Rehabil Med, Showa Univ Sch Dent

²Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent

Phox2b is a member of homeodomain transcription factors and essential for the development of the central and peripheral autonomic nervous systems. Phox2b-positive neurons have shown to be distributed in the reticular formation dorsal to the trigeminal motor nucleus (RdV). However, properties of Phox2b neurons in RdV are still unclear. In this study, we investigated electrophysiological properties of Phox2b neurons in RdV using Phox2b-EYFP knock-in rats. Transverse brainstem slices including RdV were prepared from P2-7 Phox2b-EYFP rats. Then, whole-cell recording were performed from Phox2b neurons in RdV. Phox2b neurons in RdV showed a tonic firing characteristic (53/55) and were divided into high-frequent firing (5/53) and low-frequent firing neurons (48/53). A few neurons (2/55) showed a phasic firing pattern. 25.5% (14/55), 10.3% (3/29), and 23.1% (6/26) of Phox2b neurons evoked postsynaptic currents in response to electrical stimulation of the trigeminal mesencephalic nucleus, spinal trigeminal tract and principal sensory trigeminal nucleus, respectively. 7.5% (4/53) of Phox2b neurons followed a 100-Hz triple stimulation of the trigeminal motor nucleus. These results suggest that RdV contains Phox2b neurons in the RdV that received sensory inputs from trigeminal area and may be related to processing of sensory information from oral and maxillofacial regions.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D6 ラット顎筋筋紡錘からの感覚入力を受ける三叉神経上核の同定

○佐藤 文彦, 加藤 隆史, 吉田 篤

阪大 院歯 口腔解剖 2

咀嚼筋の筋紡錘からの自己受容感覚は、顎運動に重要である。この感覚は三叉神経中脳路核 (Vmes) ニューロンによって三叉神経上核 (Vsup) に伝達されると言われている。しかし、ラットでは、Vsup の正確な位置と Vsup に入力する感覚がどこから来るのかは良くわかっていない。そこでこれらを明らかにするため、本研究では、神経トレーサーによる回路追跡法と誘発電位の脳内記録法を、ラットに用いた。その結果、ラットの Vsup は細胞構築学的に同定可能であり、trigeminal transition zone とは別の部位であった。越神経節トレーサーである cholera toxin subunit B を咬筋神経、深側頭神経、内側翼突筋神経、眼窩下神経、下歯槽神経に取り込ませた結果、Vsup は、咬筋に分布する Vmes ニューロンから最も強い投射を受け、上下の歯根膜に分布する Vmes ニューロンからはわずかな投射を受けるのみであることがわかった。また、Vsup は、細胞外記録によって電気生理学的にも同定可能であり、咬筋の電気刺激で小さくて遅い（単シナプス性を思わせる）陰性電位が記録出来、また下顎を受動的に開口させたところ、発火するマルチユニットの増加が記録出来る部位であった。本研究によって、咀嚼筋筋紡錘からの自己受容感覚が顎運動に果たしている重要性の解明に必要な基礎データを得ることが出来た。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Identification of rat supratrigeminal nucleus receiving inputs from masticatory muscle spindles

○Sato F, Kato T, Yoshida A

Dept Oral Anat Neurobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Proprioception from the masticatory muscles plays a crucial role in jaw movements. This sensation is known to be conveyed by the trigeminal mesencephalic nucleus (Vmes) neurons to the supratrigeminal nucleus (Vsup). However, little is known in rats about the exact location of the Vsup and which kinds of sensations the Vsup receives. To address these issues, we used the neuronal tract tracing and electrophysiological recording techniques. The Vsup could be cytoarchitecturally identified and distinguished from the trigeminal transition zone. After application of cholera toxin subunit B to the masseter, deep temporal, medial pterygoid, infraorbital, and inferior alveolar nerves, the results showed that the Vsup receives the strongest projections of Vmes neurons innervating the masseter muscles, but very weak projections of Vmes neurons innervating the periodontal ligaments. The cytoarchitecturally identified Vsup could also be identified electrophysiologically; in the Vsup, small, late (monosynaptic) negative potentials could be recorded after electrical stimulation of the masseter nerve, and unit spike potentials increasing their firing could be recorded during a passive jaw-opening.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D7 PRIP による脳内炎症が誘発する摂食抑制行動の調節

○山脇 洋輔, 兼松 隆

広大院医薬保 細胞分子薬理

【背景】 Phospholipase C (PLC) は, TLR4 を介した炎症反応を制御することが明らかになってきており, 我々は, PLC の構造類似体である PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) の欠損 (KO) マウスが炎症に対して脆弱性を示すことを見出した. 細菌感染などによる炎症反応は, 摂食抑制, 抑うつ気分などの中枢神経症状を引き起こす. 本研究では, 脳内炎症と PRIP の関わりを明らかとすることを目的に実験を行った. 【方法】 野生型 (WT) と KO マウス (9-11 週齢, 雄性) に lipopolysaccharide (LPS; 100 μ g/kg) を腹腔内投与し, 24 時間の摂餌量を測定した. タンパク質の活性化や発現は, western blot 法で, 遺伝子発現は, 半定量的 PCR 法やリアルタイム PCR 法で解析した. 【結果と考察】 LPS 投与マウスの摂餌量は, WT に比べて KO マウスで有意に低下していた. 摂食中枢である視床下部で摂食行動に関連する STAT3 の活性化は, KO マウスで有意に高かった. 視床下部での炎症性サイトカイン遺伝子 (IL-1 β , IL-6, TNF- α) の発現は高く, 逆に抗炎症性サイトカイン遺伝子 (IL-10) の発現は低かった. ミクログリア (MG) の初代培養実験では, LPS 刺激で誘導される IL-10 遺伝子発現は, WT に比べて KO マウスで低く, PLC シグナル下流分子である PKC の阻害薬 (Ro31-8220) 処置により, WT の MG で抑制されたが KO では変化しなかった. 一方, PKC 活性化剤 (PMA) 処置で, KO-MG での IL-10 遺伝子発現は著しく増大した. 以上より, PRIP は, MG において PLC-PKC シグナルを介して IL-10 遺伝子発現を正に調節して, 脳内炎症を抑制的に制御する分子であることが明らかとなった.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

PRIP regulates neuroinflammation-induced anorexia

○Yamawaki Y, Kanematsu T

Dept Cell Mol Pharmacol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Phospholipase C (PLC) is involved in inflammation via Toll-like receptor 4. We found that PLC-related catalytically inactive protein (prip)-deficient (KO) mice were vulnerable against inflammation. Neuroinflammation induces several brain dysfunctions, including anhedonia, sleep disorder, dysphoria, and anorexia. In this study, we investigated the role of PRIP in neuroinflammation-induced anorexia. Wild-type (WT) and KO mice were subjected to intraperitoneal administration of a lipopolysaccharide (LPS, 100 μ /kg). Daily food intake of KO mice was less than that of WT mice. The phosphorylation of STAT3 in the hypothalamus was upregulated in KO mice. The mRNA expression of pro-inflammatory cytokines was high, and anti-inflammatory cytokine (IL-10) mRNA was low in KO hypothalamus compared with WT. In primary microglia derived from KO mice, the mRNA level of IL-10 induced by LPS treatment was lower than that of WT. PMA, an activator of PKC (a downstream signaling molecule of PLC), drastically increased LPS-induced IL-10 expression in KO microglia. However, Ro31-8220, a PKC inhibitor, did not affect the expression. These results suggested that PRIP regulates LPS-induced IL-10 expression via PLC-PKC signaling and is involved in neuroinflammation-induced anorexia.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D8 矯正力負荷下の歯根膜刺激に対する大脳皮質の神経応答

○堀貫 恵利^{1,2}, 清水 典佳¹, 越川 憲明², 小林 真之²

¹日大 歯 矯正

²日大 歯 薬理

【目的】矯正治療による歯の移動に伴う痛みは、矯正治療中にしばしば遭遇する愁訴である。我々は、矯正力負荷によって生じる疼痛が高次脳に及ぼす影響について検討した。その結果、矯正力負荷 1 日後の大脳皮質感覚野において歯根膜刺激によって誘発される神経応答が著しく増大することを明らかにした。しかし、その増大した応答が持続する期間を明らかにした報告はなかった。これは矯正力が高次脳に可塑的变化を生じさせるか否かという、臨床に深くかかわる問題である。そこで本研究は、上顎臼歯に実験的矯正力を加えたラットを作製し、歯根膜刺激に対する大脳皮質での神経活動の経時的変化を明らかにすることを目的とした。【方法】SD ラットに closed coil spring で右側上顎第一臼歯と上顎切歯を接続し、50 g の矯正力を負荷したモデル動物（矯正力負荷群）を作製した。ウレタン麻酔下にて、上顎臼歯歯根膜に双極電極を挿入し固定した後、ラット左側頭部皮質を露出させ、膜電位感受性色素 RH1691 を負荷した。歯根膜の電気刺激に対する大脳皮質神経活動は、実体顕微鏡に CCD カメラを搭載した光学計測システムを用いて記録した。矯正力負荷群は処置 1 日後、3 日後および 7 日後に光学計測を行った。【結果】矯正力負荷 1 日後では、対照群と比較して上顎臼歯刺激に対する応答の最大振幅と最大応答領域が有意に増大していた。3 日後に応答は減少し、7 日後には対照群と同程度の応答に戻った。【考察】歯根膜への持続的な機械刺激によって、矯正力負荷 1 日後では歯根膜刺激への応答が亢進するが、7 日後には回復することがわかった。このことから、矯正力によって大脳皮質での長期的な可塑的变化は生じないことが明らかとなった。また、矯正力負荷後の大脳皮質神経活動が、臨床における矯正治療中の痛みと類似した経時的変化を示すことから、本実験で観察した現象は矯正治療中の痛みを反映している可能性がある。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Sequential changes in rat cortical responses to periodontal stimulation during experimental tooth movement

○Horinuki E^{1,2}, Shimizu N¹, Koshikawa N², Kobayashi M²

¹Dept Orthodont, Nihon Univ Sch Dent

²Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent

Pain and discomfort induced by tooth movement during orthodontic treatment are major problems for patients. Our previous studies have demonstrated that cortical excitatory propagation induced by stimulation of the periodontal ligament (PDL) is significantly facilitated one day after experimental tooth movement (ETM). However, no information is available about the temporal profiles of the facilitated cortical responses. We investigated a sequential change in the cortical responses to stimulation of the maxillary 1st molar PDL during ETM to examine whether orthodontic force induces neuroplastic changes in the somatosensory and insular cortices. To apply orthodontic force in ETM models, the maxillary incisors and the right first molar were bound with a closed coil spring. Optical imaging was performed at 1 day, 3 days, and 7 days after ETM. One day after ETM, cortical excitatory propagation was facilitated in comparison with controls, and the facilitation gradually recovered to the control level 3 to 7 days after ETM. These results suggest that orthodontic force does not induce a long-lasting neuroplastic change in somatosensory and insular cortices. The temporal profile of the facilitated cortical responses is comparable to that of the orthodontic pain, suggesting that these cortical areas encode the orthodontic pain.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D9 下歯槽神経損傷後の異所性疼痛に対するマクロファージの関与

○Dulguun Batbold¹, 篠田 雅路¹, 山口 聡², 岩田 幸一¹

¹日大 歯 生理

²医科歯科大 院医歯

The role of macrophages in ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury

○Batbold D¹, Shinoda M¹, Yamaguchi S², Iwata K¹

¹Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

²Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Purpose: Accidental mandibular nerve injury which occasionally occurs during molar teeth extraction or dental implant procedure frequently induces ectopic pain in the orofacial region. However, the exact mechanism of the ectopic orofacial pain is still not known. Therefore, we investigated the possible ectopic orofacial pain mechanism that interacts with immune cells in trigeminal ganglion (TG) following inferior alveolar nerve transection (IANX). **Materials & Methods:** We performed IANX under deep anesthesia in Sprague-Dawley rats (Male, 160-270g). Mechanical head-withdrawal threshold (MHWT) in the whisker pad skin ipsilateral to IANX was measured every other day for 13 days using von Frey filament. We examined Iba1 expression in TG to analyze the infiltration of macrophage in TG on day 3 after IANX, immunohistochemically. To examine the effect of macrophage infiltration in TG on ectopic orofacial pain, we measured the MHWT in the whisker pad skin ipsilateral to IANX with the successive intrathecal administration of macrophage depletion agent, liposomal clodronate clophosome-A (LCCA). Moreover, we examined TNF- α expression in TG on day 3 in IANX, IANX with LCCA, IANX with the vehicle, and sham groups. **Results & Conclusion:** MHWT in the whisker pad skin was significantly reduced, and the number of Iba1 immunoreactive (IR) cells in TG was significantly increased on day 3 after IANX. The successive intrathecal administration of LCCA greatly reduced the number of Iba1-IR cells in 1st/2nd branches of the trigeminal nerve region (V1/V2) in TG, and also recovered the reduced MHWT in the whisker pad skin. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression in TG was enhanced on day 3 after IANX, which is depressed by intrathecal administration of LCCA. These findings suggest that the infiltration of macrophages, which induce TNF- α in V1/V2 in TG was proliferated following IANX, resulting ectopic mechanical allodynia in whisker pad skin.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D10 ラット三叉神経節における VNUT を介した神経細胞, 衛星細胞, およびミクログリア様細胞間の細胞外 ATP 情報伝達

○岩井 治樹, 倉本恵梨子, 山中 淳之, 後藤 哲哉

鹿大 院医歯 機能形態

【目的】三叉神経節の神経細胞は, 一次感覚神経細胞として中枢へ感覚情報を伝達するだけでなく, 刺激を受けていない周囲の神経細胞にも影響を与えることが報告されている. 感覚神経節内の神経細胞周囲には衛星細胞およびミクログリア様細胞が存在し, これらを通じて, 他の神経細胞に影響を及ぼすことが考えられるが, これらの細胞間の情報伝達機構については未だ明らかでない. この伝達機構に細胞外 ATP の関与が示唆されているが, 我々は ATP を細胞外へ放出する小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) に着目し, これが三叉神経節内での神経細胞, 衛星細胞およびミクログリア様細胞の情報伝達に関与しているかどうかを免疫組織学的に検証することを目的とした. 【方法】ラット上顎臼歯を麻酔下で抜歯後, 経時的に灌流固定した. 三叉神経節は, 抗-ATF3 抗体 (傷害細胞のマーカー), 抗-glutamine synthetase (GS) 抗体 (衛星細胞のマーカー) および抗 IBA-1 抗体 (ミクログリア様細胞のマーカー), 抗-VNUT 抗体, 抗-P2X3 (ATP 受容体のマーカー) 抗体を用いて調べた. 【結果と考察】抜歯群および非抜歯群ともに神経細胞内において顆粒状の VNUT 免疫陽性小胞を認めた. 抜歯群において, ATF3 免疫陽性神経細胞を確認したところ, VNUT 免疫陽性小胞は, 抜歯後 3 日に顕著に増大した. また, VNUT 免疫陽性小胞は, 非抜歯群では, 細胞質内に散在していたが, 抜歯群では, いくつかの神経細胞で形質膜近傍の細胞周辺部に集積していた. 神経細胞と同様に衛星細胞においても VNUT 免疫陽性小胞が認められ, VNUT による ATP の細胞外への放出が示唆された. また, 衛星細胞およびミクログリア様細胞は, ともに P2X3 免疫陽性であった. これらのことから, 三叉神経節内では VNUT を介した神経細胞, 衛星細胞, およびミクログリア様細胞間で細胞外 ATP による活性化機構が存在し, アロディニア等の発生に関与していることが示唆された.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Extracellular ATP signaling through vesicular nucleotide transporter among neurons, satellite glia cells and microglia-like cells in the rat trigeminal ganglion

○Iwai H, Kuramoto E, Yamanaka A, Goto T

Dept Anat Oral Sci, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Neurons in trigeminal ganglion (TG) receive orofacial sensory information and would concern a modulation of pain. Recent studies have indicated that TG neurons contain vesicular nucleotide transporter (VNUT) that associates extracellular ATP release. Extracellular ATP is known to work as a transmitter in the nervous system, however, it is unclear that how extracellular ATP in TG is involved in the signal transduction among neurons, satellite glial cells (SGC), and microglia-like cells. Thus, the aim of this study was to reveal extracellular ATP signal transmission in TG cells. Rat upper molars were extracted and TG was examined using anti-VNUT antibody, anti-ATF3 antibody (a marker of damaged neuron), anti-glutamine synthetase antibody (a marker of SGC), anti-Iba1 antibody (a marker of microglia-like cells), and anti-P2X3 receptor antibody (a marker of ATP receptor). One day after tooth extraction, ATF3-IR damaged neurons emerged in the maxillary division of TG. Three days after tooth extraction, the number of VNUT-IR vesicles increased in ATF3-IR damaged neurons. Moreover, VNUT-IR vesicles were found in SGCs and P2X3 receptors were observed in both SGCs and microglia-like cells. These results suggest that extracellular ATP released by VNUT-IR vesicles would activate neuron-SGC-microglia-like cell signaling in TG.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D11 TLE3 による MyoD の転写活性制御機構

○古株彰一郎, 中富 千尋, 松原 琢磨, 自見英治郎

九歯大 健康増進 分子情報生化

Class I bHLH 型転写因子の MyoD は幹細胞から骨格筋細胞への運命決定を行うマスターレギュレーターであり, E protein とヘテロダイマーを形成し Myogenin などの標的遺伝子の発現を調節する. MyoD の転写活性は様々な因子により制御されることが知られており, これまでに Goucho/TLE ファミリーに属する TLE3 が MyoD と会合しその転写活性を抑制する可能性が示唆されているが詳しいメカニズムはわかっていない. 今回我々は TLE3 が MyoD の bHLH ドメインと会合し, MyoD と E プロテイン との複合体形成を阻害, その結果, MyoD の転写活性を抑制する可能性を見出したので報告する. まず, TLE3 が MyoD のどの部分と会合し, 転写活性を抑制するか明らかにするために MyoD の欠失変異体を作製し, 線維芽細胞株 10T1/2 細胞を用いて免疫沈降実験を行った. すると TLE3 は MyoD の bHLH ドメインと会合することが明らかとなった. MyoD は bHLH ドメインを通じて E12 や E47 などの E protein とヘテロダイマーを形成することが知られているため, 次に MyoD と E12 との複合体形成に対する TLE3 の作用を検討した. すると免疫沈降法により 10T1/2 細胞に過剰発現した TLE3 は MyoD と E12 の会合を抑制した. さらに, ルシフェラーゼアッセイにより TLE3 が抑制する MyoD の転写活性を E12 の過剰発現は濃度依存的に解除した. 以上より TLE3 は MyoD と E protein の複合体形成を阻害することでその転写活性を制御する可能性がある. またマウス長指伸筋から得られた筋線維の免疫染色により TLE3 は骨格筋の幹細胞であるサテライト細胞に発現することが明らかとなった. よって TLE3 は生理的筋分化に重要な役割を果たしているかもしれない.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

The regulatory mechanism of MyoD transcriptional activity by TLE3

○Kokabu S, Nakatomi C, Matsubara T, Jimi E

Div Mol Signal Biochem, Dept Health Promotion, Kyushu Dent Univ

The transcription factor MyoD is master regulator of myogenesis. The bHLH domain of MyoD forms a heterodimer with E proteins, such as E12 and E47, to regulate the expression of target genes. We have previously reported that the transcriptional cofactor, TLE3 interacts with MyoD and represses its transactivation. However, the exact inhibitory mechanism of TLE3 on MyoD remains to be elucidated. Here we show a novel mechanism in which TLE3 interacts with the bHLH domain of MyoD and interferes with the formation of a complex between MyoD and E-protein, which consequently results in repression of MyoD transcriptional activity. Firstly, we generated deletion mutants of MyoD to determine which domain of MyoD is essential for interaction with TLE3. Immunoprecipitation assays revealed that the bHLH domain of MyoD interacts with TLE3 in 10T1/2 cells. We next examined the effect of TLE3 on the formation of a complex between MyoD and E12. Immunoprecipitation assay also revealed that overexpression of TLE3 interferes with the complex formation. Furthermore, overexpression of E12 rescues the inhibitory effect of TLE3 on transactivation of MyoD in dose-dependent manner, suggesting that TLE3 represses the transactivation of MyoD via interfering with the formation of a complex between MyoD and E proteins.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D12 *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS が心筋, 骨格筋に及ぼす影響

○川村 直矢¹, 大貫 芳樹², 奥村 敏², 五味 一博¹, 氏家 優子¹, 梅木 大輔³,
伊藤 愛子³

¹鶴大 歯 歯周病

²鶴大 歯 生理

³鶴大 歯 矯正

【目的】歯周病と全身疾患の関連性については近年注目されているが、そのメカニズムの解明は不十分である。本研究では、歯周病が全身の筋肉に及ぼす影響について検討した。【方法】雄マウス (C57BL6/J, 8 週齢) を用いて PBS 投与群 (Control) と *Porphyromonas gingivalis* 由来の lipopolysaccharide 投与群 (PG-LPS; 4 mg/kg/day : 腹腔内投与) を作成した。4 週後, 心筋(CA), 咬筋(MA), 前脛骨筋(TA), ヒラメ筋(SOL)を摘出し, 筋重量/前脛骨長比(tibia; mg/mm) ならびに筋線維断面積(CSA; μm^2) を測定した。【結果】PG-LPS 群では Control 群に比較して MA/tibia (7.7 ± 0.29 (Control) vs 6.3 ± 0.3 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.01$) ならびに TA/tibia (3.5 ± 0.08 (Control) vs 3.2 ± 0.09 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.05$) は有意に減少したが, CA/tibia (6.7 ± 0.35 (Control) vs 8.7 ± 0.49 (PG-LPS), $n=3-6$, $P < 0.05$) は有意に増加した。なお SOL/tibia は両群間に有意差はなかった。以上の結果は CSA 測定結果でも同様の傾向を示し, MA (1693 ± 65 (Control) vs 1470 ± 59 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.01$) ならびに TA (1711 ± 42 (Control) vs 1536 ± 47 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.05$) の PG-LPS 群では減少傾向を示したが, SOL では両群間に有意差はなかった。【結論】PG-LPS の慢性投与は, マウスの心肥大と骨格筋(咬筋, 前脛骨筋)の委縮を誘導した。以上の結果は, 歯周病治療が心疾患, 咀嚼機能障害, 下肢筋力低下を予防して高齢者の健康寿命延伸に寄与する可能性を示唆している。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of LPS generated from *Porphyromonas gingivalis* on muscle mass in the whole body

○Kawamura N¹, Ohnuki Y², Okumura S², Gomi K¹, Ujiie Y¹, Umeki D³, Ito A³

¹Dept Periodontol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Periodontal disease might play an important role for the development of systemic disease but the mechanisms remains poorly understood. We thus examined the effect of periodontal disease on the muscle mass within the whole body. Male mice (C57BL6/J, 8-week-old) were treated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (PG-LPS) (20ug/mouse/day ip) for 4 weeks. Control mice received an identical volume of saline only. After 4 weeks, we examined muscle mass to tibial length ratio (mg /mm) and muscle fiber cross sectional area (CSA; μm^2) of masseter (MA), tibialis anterior (TA), soleus (SOL) and cardiac muscle (CA). MA /tibia and TA/tibia were significantly decreased by the treatment of PG-LPS from baseline (MA/tibia: 7.7 ± 0.29 (Control) vs 6.3 ± 0.3 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.01$; TA/tibia (3.5 ± 0.08 (Control) vs 3.2 ± 0.09 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.05$). Conversely, CA/tibia was significantly increased from baseline (6.7 ± 0.35 (Control) vs 8.7 ± 0.49 (PG-LPS), $n=3-6$, $P < 0.05$). However, SOL/tibia was not altered by the treatment of PG-LPS. We also confirmed the above data by the measurement of CSA. These data indicate that PG-LPS treatment might exert atrophic effects on MA and TA but it might exert hypertrophic effect on CA, suggesting that it might contribute to the favorable effects on health expectancy in elderly persons.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D13 β_2 アドレナリン受容体刺激による cAMP 活性化因子 Epac1 依存性の筋肥大効果

○大貫 芳樹¹, 梅木 大輔², 成山明具美³, 伊藤 愛子², 川村 直矢⁴, 八木澤由佳², 奥村 敏¹

¹鶴大 歯 生理

²鶴大 歯 矯正

³鶴大 歯 小児歯

⁴鶴大 歯 歯周病

【目的】 β_2 アドレナリン受容体 (β_2 -AR) 作動薬であるクレンブテロール (CB) の慢性投与が骨格筋の肥大を誘発することから, β_2 -AR シグナル伝達経路は筋萎縮治療の新たなターゲットと考えられている. しかしながら, 咬筋や前脛骨筋などの速筋と比べ, ヒラメ筋などの遅筋では CB による筋肥大効果が小さく, またその分子機序も不明である. 最近我々は, β -AR シグナル伝達経路のセカンドメッセンジャーである cAMP により活性化される因子 Epac (exchange protein activated by cAMP) が CB 投与による咬筋の肥大に関与することを観察した. 今回の実験では, Epac1 遺伝子欠損マウス (Epac1KO) を用い, 速筋および遅筋における CB の筋肥大効果に対する Epac1 の役割を明らかにすることを目的とした. **【方法】** Wild type (WT) および Epac1KO マウスを, それぞれ対照群と CB 投与群 (2 mg/kg/day, I.P.) に分け, 計 4 群とした. 3 週間飼育後, 前脛骨筋 (速筋) とヒラメ筋 (遅筋) を摘出し, 筋重量および筋線維断面積を解析した. また, cAMP レベルおよび Akt や CaMKII などの筋肥大誘発シグナル因子のリン酸化レベルを定量的に解析した. **【結果】** CB 投与により, WT の前脛骨筋では Akt と CaMKII の活性化を伴う筋肥大が誘発されたのに対し, Epac1KO の前脛骨筋ではそれらは観察されなかった. また, ヒラメ筋では WT と Epac1KO 共に, CB 投与による影響を受けなかった. 一方, cAMP の加水分解酵素である phosphodiesterase 4D の発現レベルはヒラメ筋では前脛骨筋より 12 倍高く, また cAMP レベルは前脛骨筋では WT と Epac1KO 共に, CB 投与により有意に増加したのに対し, ヒラメ筋では有意な増加は観察されなかった. **【結論】** CB 投与による β_2 -AR の慢性刺激は, 前脛骨筋などの速筋では cAMP/Epac1 依存性に Akt および CaMKII シグナル伝達経路を活性化し筋肥大を誘発するのに対し, ヒラメ筋などの遅筋ではこれらのシグナル伝達経路の活性化および筋肥大を誘発しない. **【利益相反】** 利益相反状態にはありません.

Epac1-dependent hypertrophic effects of beta-2-adrenoceptor stimulation differ between slow- and fast-twitch muscles

○Ohnuki Y¹, Umeki D², Nariyama M³, Ito A², Kawamura N⁴, Yagisawa Y², Okumura S¹

¹Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med

⁴Dept Periodontol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

To elucidate the role of Epac1 (exchange protein activated by cAMP 1) in the differential hypertrophic effect of clenbuterol (CB), a selective beta-2-adrenoceptor (AR) agonist, between slow- and fast-twitch muscles, we examined the effects of CB treatment (i.p., 2 mg/kg/day for 3 weeks) on myofiber cross-sectional area, activities of beta-2-AR signaling components and cAMP levels in tibialis anterior (TA, a typical fast-twitch muscle) and soleus (SOL, a typical slow-twitch muscle) muscles of wild-type (WT) and Epac1-null (Epac1KO) mice. In TA muscle, the CB treatment induced hypertrophy through activation of Akt and calmodulin kinase II (CaMKII) signaling pathways in WT, but not in Epac1KO. On the other hand, in SOL muscle, the CB treatment did not induce hypertrophy as well as activation of these signaling pathways in either WT or Epac1KO. Expression level of phosphodiesterase 4D was about 12-fold greater in SOL than in TA. In addition, the CB treatment significantly increased cAMP levels in TA, while not in SOL. These results suggest that cAMP/Epac1 plays important roles in the beta-2-AR-mediated hypertrophy through subsequent activation of both Akt and CaMKII signaling pathways in fast-twitch muscles rather than in slow-twitch muscles, accounting for the differential hypertrophic effect of CB between the muscles.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D14 咬筋における β アドレナリン受容体のサブタイプ特異的な役割

○伊藤 愛子¹, 大貫 芳樹², 梅木 大輔¹, 石川美佐緒³, 川村 直矢⁴, 八木澤由佳¹,
中村 芳樹¹, 奥村 敏²

¹鶴大 歯 矯正

²鶴大 歯 生理

³鶴大 歯 口腔解剖

⁴鶴大 歯 歯周病

【目的】 β アドレナリン受容体 (β -AR) シグナルのサブタイプ特異的な病態生理学的役割に関する研究は、主に心筋を用いて行われてきたが、骨格筋を用いた研究は非常に少ない。本研究では、マウスを用いて β_1 -AR 特異的作動薬ドブタミン (DOB) ならびに β_2 -AR 特異的作動薬クレンブテロール (CB) の慢性投与が、咬筋、ヒラメ筋および心筋に及ぼす影響を調べた。

【方法】雄性マウス (C57BL/6, 12 週齢) を、Control 群, DOB 投与群 (2 mg/kg/day, i.p.), CB 投与群 (2 mg/kg/day, i.p.), の 3 群に分け、1 週後に咬筋, ヒラメ筋, 心筋を摘出し、筋重量/脛骨長比 (mg/mm) ならびに筋線維断面積 (μm^2) を計測した。

【結果】咬筋重量は、Control 群と比較して、DOB 投与群 (β_1 刺激) では増加しなかった (DOB vs. Control: 5.4 ± 0.14 vs. 5.3 ± 0.16 , $P = \text{NS}$, $n = 5-6$) が、CB 投与群 (β_2 刺激) では有意に増加した (CB vs. Control: 6.2 ± 0.20 vs. 5.3 ± 0.16 , $P < 0.05$, $n = 5-6$)。ヒラメ筋重量は、Control 群と比較して、DOB 投与群ならびに CB 投与群のいずれも増加しなかった (DOB vs. Control: 0.53 ± 0.03 vs. 0.53 ± 0.05 , $P = \text{NS}$, $n = 5-6$; CB vs. Control: 0.51 ± 0.03 vs. 0.53 ± 0.05 , $P = \text{NS}$, $n = 5-6$)。一方、心筋重量は Control 群と比較して、DOB 投与群ならびに CB 投与群のいずれも有意に増加した (DOB vs. Control: 8.1 ± 0.76 vs. 6.0 ± 0.23 , $P < 0.001$, $n = 5-6$; CB vs. Control: 7.5 ± 0.24 vs. 6.0 ± 0.23 , $P < 0.001$, $n = 5-6$)。また、筋線維断面積の測定結果も、筋重量測定結果と同様の傾向を示した。

【結論】咬筋では β_2 刺激でのみ筋肥大が誘導されたのに対し、心筋では β_1 および β_2 刺激のいずれでも筋肥大が誘導された。また、ヒラメ筋では β 刺激で筋肥大は誘導されなかった。これらの結果は、筋の種類で β アドレナリン受容体のサブタイプ特異的な役割が異なることを示唆する。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Role of β -adrenergic receptor subtype-specific signaling on masseter muscle

○Ito A¹, Ohnuki Y², Umeki D¹, Ishikawa M³, Kawamura N⁴, Yagisawa Y¹, Nakamura Y¹,
Okumura S²

¹Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Oral Anat, Tsurumi Univ Sch Dent Med

⁴Dept Periodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Pathophysiological role of β -adrenergic receptor (β -AR) signaling in cardiac muscle has been examined in detail. However, its role in skeletal muscle remains unclear. We thus examined the role of β -AR subtype-specific role on masseter muscle by measuring the muscle mass to tibial length (mg/mm) ratio and the fiber cross-sectional area (μm^2) of masseter muscle in male mice (C57BL/6) after intraperitoneal infusion of dobutamine (DOB; 2 mg/kg/day), a β_1 -AR-specific agonist, or clenbuterol (CB; 2 mg/kg/day), a β_2 -AR-specific agonist, for 1 week.

Masseter mass was significantly increased in CB-treated group, compared to the Control (CB vs. Control: 6.2 ± 0.20 vs. 5.3 ± 0.16 , $P < 0.05$, $n = 5-6$), but not in DOB-treated group (DOB vs. Control: 5.4 ± 0.14 vs. 5.3 ± 0.16 , $P = \text{NS}$, $n = 5-6$). Conversely, cardiac mass was significantly increased in both DOB-treated and CB-treated groups (DOB vs. Control: 8.1 ± 0.76 vs. 6.0 ± 0.23 , $P < 0.001$, $n = 5-6$; CB vs. Control: 7.5 ± 0.24 vs. 6.0 ± 0.23 , $P < 0.001$, $n = 5-6$). These results were confirmed by the measurement of cross-sectional area. Selective stimulation on β_1 stimulation induced hypertrophy only in the myocardium, while that on β_2 induced hypertrophy in both masseter muscle and cardiac muscle.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D15 骨芽細胞と脂肪細胞の分化におけるプロテインホスファターゼ PP2A C α の役割

○岡村 裕彦¹, 吉田 賀弥^{1,2}, 寺町 順平²

¹徳大 院医歯薬 口腔組織

²徳大 院医歯薬 口腔保健教育

PP2A は細胞の分化・増殖やアポトーシスに関与するセリン/スレオニンプロテインホスファターゼである。PP2A は触媒サブユニット (PP2A C α) を中心に三量体を形成し、様々な蛋白質の脱リン酸化に関与する。今回我々は、骨芽細胞および脂肪細胞分化における PP2A C α の役割について検討した。【方法】1. 分化誘導培地で培養した骨芽細胞と脂肪前駆細胞において PP2A C α の発現と PP2A 活性を調べた。2. PP2A C α の発現を抑制した MC3T3-E1 細胞 (shPP2A-ob) と C3H10T1/2 細胞 (shPP2A-adipo) を樹立し、リアルタイム PCR や各種染色を用いて、それぞれの細胞分化能を調べた。3. shPP2A-ob 細胞と未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 細胞を共培養し、リアルタイム PCR, Oil red O 染色, Triglyceride assay を用いて、脂肪細胞分化に与える影響について検討した。【結果と考察】骨芽細胞および脂肪細胞の分化に伴い PP2A C α の発現および PP2A 活性が低下した。shPP2A-ob 細胞では Osterix, Bone sialoprotein, Osteocalcin 等の骨分化マーカーの発現が増加し、骨芽細胞分化能が亢進した。shPP2A-adipo 細胞では PPAR γ や C/EBP α 等の発現が増加し、脂肪細胞分化能が亢進した。shPP2A-ob 細胞と共培養した C3H10T1/2 細胞では脂肪分化マーカーの発現と細胞内トリグリセリド蓄積が促進された。以上の結果から、PP2A C α は、骨芽細胞と脂肪細胞の分化を調節する重要な因子であることが分かった。さらに、骨芽細胞の PP2A C α 発現は未分化間葉系細胞の脂肪細胞分化に関与すると考えられる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

PP2A Ca is involved in osteoblast and adipocyte differentiation

○Okamura H¹, Yoshida K^{1,2}, Teramachi J²

¹Dept Histol Oral Histol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

²Dept Oral Health Care Educ, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

The serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A) regulates many important physiological processes. In this study, we investigated the roles of alpha-isoform of PP2A catalytic subunit (PP2A Ca) in osteoblast and adipocyte differentiation. The expression and phosphatase activity of PP2A Ca decreased during both osteoblast and adipocyte differentiation. To further clarify the role of PP2A Ca in osteoblast and adipocyte differentiation, we established PP2A knockdown cells (shPP2A) by infecting lentivirus particles expressing shRNA specific for PP2A Ca. shPP2A cells showed accelerated osteoblast and adipocyte differentiation with the upregulation of specific genes in each type of cells. To examine the effect of PP2A Ca in osteoblasts on adipocyte differentiation, mesenchymal stem C3H10T1/2 cells were co-cultured with shPP2A cells. shPP2A cells revealed higher ability to induce adipocyte differentiation and the expression of adipocyte marker genes in C3H10T1/2 cells. Our results indicate that PP2A Ca plays important roles in the regulation of mesenchymal cell differentiation through the expression of transcription factors. In addition, PP2A Ca in osteoblasts is considered to be involved in controlling adipocyte differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D16 エピプロフィンによる骨代謝調節

○中村 卓史¹, 中村 友昭^{1,2}, 若森 実¹, 福本 敏²

¹東北大 院歯 歯科薬理

²東北大 院歯 小児歯

Epfm は Sp ファミリーに属する転写因子で、発生中の歯胚、毛根、上皮、性器、そして四肢に発現する。Epfm の生体での機能を解析する事を目的として、Epfm 遺伝子欠損マウス (Epfm-KO) を作成した。Epfm-KO は、多数の過剰歯形成、エナメル欠損、毛包形成障害等の表現型を認めた。また、X 線解析およびマイクロ CT 解析にて骨密度低下など骨形成異常を呈していることが明らかとなった。興味深いことに骨芽細胞において Epfm の遺伝子発現は認められなかった。この結果より Epfm が間接的に骨形成を制御していることが示唆された。Epfm-KO の組織解析により副甲状腺の肥大化を認め、血中副甲状腺ホルモン (PTH) は高値を示していたことから、Epfm-KO が副甲状腺機能亢進症を発症していることが強く示唆された。Epfm による PTH 遺伝子転写制御を解析するために、ラット副甲状腺細胞株、PT-r、マウス副甲状腺器官培養系を用いた。低カルシウム培養液で、PT-r を培養すると PTH 遺伝子発現が誘導されるが、Epfm を過剰発現すると誘導された PTH 遺伝子発現が抑制された。また、副甲状腺器官培養系において Epfm をノックダウンさせたところ、培養液中のカルシウム濃度を上昇させても PTH の産生量に変化はなく、カルシウム濃度上昇に伴う PTH 遺伝子発現抑制機構が破綻していることが示唆された。さらに、ヒト PTH プロモーター解析において、Epfm が PTH 遺伝子を抑制する働きがあることが示唆された。これらの結果から、Epfm は血中カルシウム上昇に伴う PTH 遺伝子発現抑制に関与し、Epfm KO では、PTH の抑制機構が破綻し原発性副甲状腺機能亢進症を発症することが明らかとなった。CaSR の下流で Epfm が機能していることが示唆されるため、Epfm は、PTH コントロールの新たな創薬のターゲットになりうると考えている。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

A novel role of Epiprofin in bone metabolism

○Nakamura T¹, Nakamura T^{1,2}, Wakamori M¹, Fukumoto S²

¹Div Mol Pharmacol Cell Biophys, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Previously, we identified Epiprofin (Epfm) that is a master gene for ameloblasts and regulates cell proliferation and differentiation of epithelial cells. Epfm-deficient mice are characterized by a significant decrease in bone density and volume. Searching for possible explanations, we analyzed Epfm gene expression in wild type bone tissue and cells, but found that it was virtually undetectable. After further inquiry, we discovered that Epfm is abundantly expressed in the parathyroid gland, but not thyroid gland or surrounding tissues. Interestingly, when we examined the parathyroid gland itself in mutant mice, it was enlarged. Given that one function of the parathyroid gland is to sense blood calcium levels, we asked whether Epfm gene expression is influenced by calcium levels. *In vitro* experiments with an epithelial cell line do support this notion. These and other preliminary data strongly indicate that Epfm is a novel and previously unsuspected regulator of bone homeostasis. Epfm could exert its roles by acting in the parathyroid gland and participating in its responses to blood calcium levels and modulations of PTH gene expression and secretion. It could also act more broadly and regulate parathyroid growth and cellularity.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D17 新規 Gap junction protein, Pannexin 3 は connexin 43 とは違う機能と発現パターンを示しながら骨形成を制御する

○石河 真幸¹, Geneva Williams², 池内 友子³, 酒井 陽³, 福本 敏⁴, 山田 吉彦³

¹東北大 院歯 歯科保存

²ワシントン大

³米国立衛生研

⁴東北大 院歯 小児歯

細胞間及び外コミュニケーションは、細胞機能、増殖、分化そして死に重要な役割を担う。近年、細胞内外における gap junction タンパクを介した小分子の伝達機能は多分野で注目を浴びている。骨成長における研究において、骨芽細胞に強く発現する Gap junction タンパクは、Pannexin 3 (Panx3) と connexin 43 (Cx43) であるが、お互いの機能の違いは明らかにされていない。そこで、今回、我々は Panx3 と Cx43 の骨形成における機能識別及び関係性の解明のため Panx3^{-/-} マウスおよび Panx3^{-/-};Cx43^{-/-} マウスを作製し、それらの骨における表現系を Cx43^{-/-} マウスのものと比較した。始めに、Panx3^{-/-} 新生児マウスは軟骨性骨化および膜性骨化において異常があり、結果、体が小さく、骨密度の減少を示した。また、Panx3^{-/-};Cx43^{-/-} マウスの骨形成不全は Panx3^{-/-} マウスの表現系と類似するものであった。一方、Cx43^{-/-} 新生児マウスは頭蓋骨における石灰化不全を除いては、明らかな骨形成異常は認められなかった。さらに、Panx3^{-/-} マウスにおいて、軟骨細胞および骨芽細胞の細胞増殖の促進及び分化の抑制が認められた。また、Panx3 が転写因子 Osx の発現調整を行うことで、ALP, Ocn および Cx43 といった骨芽細胞分化マーカーの発現を制御していることがわかった。そして、骨細胞分化過程において Cx43 が成熟期で発現が促進される一方、Panx3 は初期に発現の誘導が起こり、成熟期ではその発現が減少することも明らかになった。さらに、Panx3 は Cx43 と違って骨芽細胞を分化させるために Hemichannel や Gap junction channel の機能の他にも ER Ca²⁺ channel の働きを有しており、Cx43^{-/-} マウス由来骨芽細胞を用いた分化実験において、Panx3 の強制発現によりその石灰化不全をレスキューできた。このように、我々は、骨形成において Panx3 と Cx43 は明らかな発現パターンの違いおよび機能の相違を有していることを明らかにできた。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Pannexin 3 and connexin 43 modulate skeletal development through their distinct functions and expression patterns

○Ishikawa M¹, Geneva W², Ikeuchi T³, Sakai K³, Fukumoto S⁴, Yamada Y³

¹Div Oper Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Div Biol Biomed, Washington Univ in St Louis

³Lab Cell Dev Biol, Natl Inst Dent Craniofac Res, Natl Insts Health

⁴Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Cell-cell and cell-matrix communication regulates the activation of signaling pathways involved in cell functioning, proliferation, differentiation and death. Gap junction proteins play important roles in such cellular communication. Pannexin 3 (Panx3) and connexin 43 (Cx43) are two major gap junction proteins expressed in osteoblasts. Here, we studied their functional relationships in skeletal formation by generating Panx3^{-/-} and Panx3^{-/-};Cx43^{-/-} mice and comparing their skeletal phenotypes with Cx43^{-/-} mice. Panx3^{-/-} mice displayed defects in endochondral and intramembranous ossification, resulting in severe dwarfism and reduced bone density. The skeletal abnormalities of Panx3^{-/-};Cx43^{-/-} mice were similar to those in Panx3^{-/-} mice. The gross appearance of newborn Cx43^{-/-} mice showed no obvious abnormalities except for less mineralization of the skull. In Panx3^{-/-} mice, proliferation of chondrocytes and osteoblasts increased and differentiation of these cells was inhibited. Expression of Panx3 was induced in the early differentiation stage and reduced in the later maturation stage of osteoblasts when Cx43 expression increased for mineralization. Furthermore, only Panx3 functioned as an ER Ca²⁺ channel to promote differentiation, and it could rescue mineralization defects in Cx43^{-/-} calvarial cells. Our findings revealed that Panx3 and Cx43 have distinct functions and expression pattern in skeletal formation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D18 PKR は骨芽細胞において *Porphyromonas gingivalis* が誘導する NLRP3 発現を NF- κ B 経路を介して制御する

○吉田 賀弥¹, 岡村 裕彦²

¹徳大 院医歯薬 口腔保健教育

²徳大 院医歯薬 口腔組織

背景感染などにより誘導され免疫や代謝に関与する蛋白質リン酸化酵素 double stranded RNA-dependent kinase (PKR) は、骨芽細胞分化の調節因子でもある。インフラマソームの構成要素である NLRP3 は、感染時に転写因子 NF- κ B により発現調節され、caspase-1 を介して活性型 IL-1 β を産生し炎症を引き起こす。近年、PKR が NLRP3 活性を調節し免疫や炎症を制御することが報告されたが、歯周病での歯槽骨吸収における両者の機能は不明である。目的 PKR が歯周病における歯槽骨吸収に関与するかを解明するために、歯周病原菌を感染させた骨芽細胞において、PKR が NLRP3 の発現を調節する機構について検討した。方法標識蛋白質 SNAP26b を発現させた *P. gingivalis* ATCC:33277 (*S-P. g.*) を嫌気培養して調整した後、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞の培養上清中に添加した。各因子の発現量やリン酸化状態をリアルタイム PCR やウエスタンブロット法にて判定し、転写活性をルシフェラーゼ法により測定した。shRNA により PKR 発現を抑制した MC3T3-E1 細胞 (shPKR 株) を樹立した。結果と考察 *S-P. g.* は、PKR のリン酸化を誘導し、NLRP3 や切断型 caspase-1 (p10)、IL-1 β の発現量を増加させた。同時に *S-P. g.* は、NF- κ B のリン酸化や、転写活性を上昇させた。shPKR 株では *S-P. g.* による NLRP3 発現亢進や NF- κ B のリン酸化及び転写活性の上昇は見られなかった。NF- κ B 阻害剤を前処理すると、*S-P. g.* が亢進した NLRP3 mRNA 発現の一部が解除された。以上の結果より、骨芽細胞において *S-P. g.* により活性化した PKR が NLRP3 発現を亢進すること、その機序の一部に NF- κ B が関与することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

PKR regulates *Porphyromonas gingivalis*-induced NLRP3 expression through by NF- κ B pathway in osteoblasts

○Yoshida K¹, Okamura H²

¹Dept Oral Health Care Educ, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

²Dept Histol Oral Histol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

Introduction: The PKR, which mediates the immune and inflammation, is an essential kinase for osteoblasts differentiation. The NLRP3 inflammasome is induced by bacteria through by NF- κ B pathway, resulting in caspase-1 cleavage (p10) and interleukin (IL)-1 β release. The inflammasome activation progresses inflammatory and immune responses. However PKR is recently reported to mediate NLRP3 activity in immune responses, its roles on bone resorption in periodontal diseases is little known. **Objective:** To examine the effects of PKR on the expression of NLRP3 in *P. gingivalis*-infected osteoblasts. **Methods:** *P. gingivalis* ATCC:33277 expressed SNAP-26b tag-protein (*S-P. g.*) was established and applied into cultured medium of mouse osteoblasts, MC3T3-E1. The expression of each factor was analyzed by real time PCR and western blot. The transcriptional activity of NF- κ B was assessed by luciferase assay. PKR expression was down-regulated by shRNA in MC3T3-E1 cells (shPKR). **Results & Discussion:** *S-P. g.* increased PKR phosphorylation and NLRP3, p10 and IL-1 β expression. *S-P. g.* increased the NF- κ B phosphorylation and activity. The activation of NLRP3 and NF- κ B induced by *S-P. g.* was not observed in shPKR cells. In the cells treated with NF- κ B inhibitor, *S-P. g.*-induced NLRP3 was partially decreased. Our results suggested that PKR activated by *S-P. g.* increases NLRP3 expression through by NF- κ B pathway in osteoblasts.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D19 BMP9 は Wnt 非依存的に骨芽細胞の GSK3 β / β -catenin シグナルを活性化する

○松口 徹也¹, 榮樂奈保子², 楠山 譲二¹, 大西 智和¹

¹鹿大 院医歯 口腔生化

²鹿大 院医歯 歯周病

【目的】 Bone Morphogenetic Protein (BMP)ファミリーは骨形成に重要な役割を果たす。その中でも BMP9 は BMP2 と同様に強い骨誘導作用を示すが、その細胞内シグナル伝達機構の詳細は不明である。今回、BMP9 の骨芽細胞内シグナル伝達機構を解析し、BMP2 との相違点を検討した。**【方法】** マウス新生仔頭蓋骨由来骨芽細胞およびマウス骨芽細胞株 (MC3T3-E1, 10T1/2) を、リコンビナント BMP2, BMP9 で刺激し、ウェスタンブロッティング法によって細胞内シグナル伝達分子の活性化を、定量 RT-PCR 法にて BMP 反応性の遺伝子発現誘導を解析した。**【結果と考察】** マウス頭蓋骨由来骨芽細胞および 2 つの骨芽細胞株において、BMP9 刺激は BMP2 と同様に Smad1/5 の急速なリン酸化を誘導したが、BMP2 に比べて顕著な Raf キナーゼ、GSK3 β のリン酸化と、細胞内 β -catenin 蛋白質量の増加を誘導した。一方 MAP キナーゼ (ERK, p38) リン酸化は微弱に亢進したのみであった。BMP9 による GSK3 β のリン酸化誘導は、シクロヘキシミド (蛋白合成阻害薬) や Brefeldin A (蛋白分泌阻害薬) によって抑制されず、Wnt 分泌誘導を介しない直接的な機構によるものと考えられた。また、BMP9 による GSK3 β のリン酸化は ERK, p38, JNK の阻害薬では抑制されなかったが、特異的 Raf キナーゼ阻害薬である L-779,450 によって著明に抑制された。これらの結果から、BMP2 と BMP9 の骨誘導における細胞内シグナル伝達機構の相違が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

BMP9 activates GSK3 β / β -catenin signaling in osteoblasts independently of Wnt

○Matsuguchi T¹, Eiraku N², Kusuyama J¹, Ohnishi T¹

¹Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Dept Periodontol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Introduction: Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) play important roles in skeletal development. Especially, BMP9, as well as BMP2, have been reported to be potent inducers of bone tissues. However, the details of intracellular signal transduction mechanisms of BMP9 remain ambiguous. Here, we have analyzed differences of signal transduction mechanisms between BMP9 and BMP2 in osteoblasts. **Results & Discussion:** We stimulated newborn mouse calvaria-derived osteoblasts and two mouse osteoblast cell lines (MC3T3-E1 and 10T1/2) with recombinant BMP9 or BMP2. We analyzed activation of intracellular signal transducers and BMP-responsive gene expressions by Western blotting and realtime RT-PCR, respectively. Being similar to BMP2, BMP9 induces rapid phosphorylation of Smad1/5. BMP9 induced phosphorylation of Raf and GSK3 β kinases more significantly than BMP2, and increased intracellular β -catenin protein. Phosphorylation of MAP kinases (ERK, p38) was only marginally induced by BMP9. BMP9-induced GSK3 β phosphorylation was not inhibited by cycloheximide (protein synthesis inhibitor) or Brefeldin A (protein secretion inhibitor), indicating it is direct and independent of Wnt protein secretion. Additionally, BMP9-induced GSK3 β phosphorylation was not affected by ERK, p38, or JNK inhibitor, but significantly inhibited by a specific Raf kinase inhibitor, L-779,450. Taken together, our findings have revealed differences of signal transduction mechanisms between BMP9 and BMP2 in osteoblasts.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D20 RANKL 結合ペプチド(OP3-4)の注射投与は、BMP-2により誘導されるマウス上顎の骨造成を促進する

○上原 智己¹, 田村 幸彦², 宮新美智世¹, 青木 和広²

¹医科歯科大 院医歯 小児歯

²医科歯科大 院医歯 硬組織薬理

口唇口蓋裂等の先天的な顎骨欠損を伴う症例や、顎堤が吸収し補綴治療が困難な症例に対し、顎骨を造成する治療は有用である。bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)の骨形成作用は広く知られているが、骨形成に必要なBMP-2の高用量使用が、炎症の発現や発がんリスクの上昇などを引き起こすことが報告されている。そこで我々は、骨形成に必要なBMP-2の量を減らす薬剤候補として、骨芽細胞上のreceptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)に結合する、RANKL結合ペプチドを開発してきた。また、従来の顎骨造成は切開や縫合等の侵襲性の高い外科処置を伴うため、低侵襲性の治療が望まれている。本研究の目的は、RANKL結合ペプチドの1つであるOP3-4ペプチド(OP3-4)によって、BMP-2の骨形成作用の促進へ与えられる影響と、薬剤の注射投与によるマウスの顎骨造成の可否を明らかにすることである。実験方法としては、OP3-4とBMP-2を含ませた粒子状ゼラチンハイドロゲル担体を、マウス上顎の切歯と第一大臼歯の間の歯隙に骨膜下注射した。術後28日目に、BMP-2単独群と比べて骨塩量・骨密度の有意な上昇を伴う明らかな骨造成が認められた。蛍光ラベリング観察の結果、造骨部位の石灰化は外側が先に、内側が後に生じることが示唆された。さらに、OP3-4は骨形成の初期過程に関与し、術後7日目においてBrdU(+)の細胞数を上昇させ、術後10日目において*Runx2*と*Colla1*の発現を上昇させることが明らかとなった。本研究結果はRANKL結合ペプチドであるOP3-4がBMP-2の有する骨形成作用を促進することを示した初めての研究報告であり、簡便かつ低侵襲に顎骨造成を行う革新的な技術開発へとつながる可能性を示している。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Injection of RANKL-binding peptide OP3-4 promotes BMP-2-induced maxilla augmentation in mice

○Uehara T¹, Tamura Y², Miyashin M¹, Aoki K²

¹Dept Pediatr Dent, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Div Pharmacol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

High-dose-treatment of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) is necessary to induce osteogenesis, however, this treatment regimen is associated with adverse effects, including inflammation and carcinogenesis. The supplementation of other bone-augmenting agents is considered helpful for preventing such side effects by reducing the amount of BMP-2 required to obtain a sufficient amount of bone. The purpose of this study is to examine the feasibility of administering receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-binding peptide OP3-4 as a potential bone-augmenting agent using an injectable gelatin hydrogel (GH) carrier. The GH carrier containing OP3-4 with BMP-2 was subperiosteally injected into the murine maxillary right diastema between the incisor and the first molar. After 28 days, the higher bone mineral density and content of local bone formation was observed compared to the GH containing BMP-2 group. Fluorescent labeling revealed that the mineralization outside the newly formed bone occurred prior to that in the inner region. Furthermore, OP3-4 increased the BrdU-positive cell number on day 7 and the *Runx2* and *Colla1* expressions on day 10. In conclusion, we demonstrated, for the first time, that the injection of OP3-4 promoted BMP-2-induced osteogenesis, which could thus become an effective and noninvasive means of alveolar bone augmentation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D21 JNK シグナリングは骨芽細胞の多様性分化を制御する

○楠山 譲二, 大西 智和, 松口 徹也

鹿大 院医歯 口腔生化

【背景】 オステオポンチン(OPN)は骨分化マーカーの1つで, サイトカイン様の働きで慢性骨代謝性疾患における炎症に関わることが推定されている. 我々は最近, 骨分化誘導時に c-Jun N-terminal Kinase (JNK)活性を抑制すると, 石灰化基質形成が阻害され, オステオカルシン(OCN)の発現が抑制されるが, OPN の発現が著しく上昇した骨芽細胞が出現することを見出した. 本研究は骨芽細胞には石灰化誘導型の一般的分化形式(OCN型)と OPN を多量発現する分化形式(OPN型)が存在し, 分化誘導条件の違いで分化形式の方向が変化する可能性を検討した. 【方法と結果】 C57BL/6 マウス由来骨芽細胞及び骨芽細胞株 MC3T3-E1 をアスコルビン酸, BMP2, FGF2 で JNK 阻害剤存在下に分化誘導すると, 細胞種や分化誘導因子の差異によらず, OCN を発現せず OPN を高発現する細胞が出現した. また OPN 型と OCN 型の分化方向の変化には, 骨分化ごく初期の JNK 活性が重要であることが分かった. JNK 内因性制御分子である JNK 特異的フォスファターゼ DUSP16 欠損マウスでは, OPN 型骨芽細胞の出現率が減少し, 血清中 OPN 量は有意に低かった. 次に未分化骨芽細胞, OCN 型, OPN 型の発現遺伝子を網羅解析し, OPN 型に特徴的な分泌タンパク質群と, 特異的表面発現分子群を見出した. 更に OPN 分泌型への分化制御因子として, inhibitor of differentiation 4 (Id4)を同定した. Id4 を強制発現させると OPN 分泌型の出現比は増加し, Id4-shRNA の導入は JNK 活性阻害によって誘導される OPN 型の出現を抑制した. その分子機構として, 抑制性転写因子 Hey1 が OPN プロモーター部位に結合しており, Id4 は Hey1 と複合体を形成し, Hey1 の機能を阻害することで, OPN 分泌型骨芽細胞への分化を誘導していることが示唆された. 【考察】 骨芽細胞分化には OCN 型と OPN 型のような多様な分化形態が存在し, これは初期の JNK 活性によって制御される Id4 の発現量の増減で調節されている可能性がある.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

JNK signaling regulates multifunctional differentiation of osteoblasts

○Kusuyama J, Ohnishi T, Matsuguchi T

Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Osteopontin (OPN) is osteogenic marker protein which have regulatory effects on inflammatory diseases and bone metabolic disorders. We previously reported that specific inhibition of c-jun N-terminal kinase (JNK) significantly inhibited osteogenic differentiation characterized by matrix mineralization and the gene expression of osteocalcin (OCN). In contrast, JNK inactivation did not inhibit the OPN expression. We hypothesized that there are multifunctional types of osteogenic differentiation, such as OCN secretion type and OPN secretion type. OPN-highly expressing cells were induced to differentiated by ascorbic acid, BMP-2, or FGF-2 with JNK-specific inhibitor in both primary osteoblasts and MC3T3-E1 cells. We found that initial JNK activity was essential for the induction of OPN type osteoblasts. The appearance of OPN type was decreased in DUSP16, a JNK specific phosphatase, knockout mouse. Gene expression analysis using DNA microarray revealed that OPN type osteoblasts specifically express secretory proteins and some surface markers. Moreover, inhibitor of differentiation 4 (Id4) suppressed the inhibitory effect of Hey1 on OPN promoter activity and regulated the induction of OPN type osteoblasts. Our findings suggested that JNK signaling regulates multifunctional differentiation of OPN and OCN type osteoblasts.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D22 タモキシフェン誘導性 CCN2 欠損マウス由来の骨細胞様細胞の破骨細胞形成能

○西田 崇¹, 久保田 聡^{1,2}, 滝川 正春²

¹岡大 院医歯薬 口腔生化

²岡大 歯 歯先端研セ

昨年の本学会で、我々は組換え CCN2 タンパク質(rCCN2)を添加したコラーゲンゲル内で3次元培養したマウス骨細胞様細胞株 MLO-Y4 によって、そのコラーゲンゲル上に播種したマウスマクロファージ系細胞株 RAW264.7 が GST 融合 RANKL (GST-RANKL)による破骨細胞形成の誘導をさらに促進したことを報告した。今回、この結果を検証するため、タモキシフェン誘導性 CCN2 欠損マウスを作製し、タモキシフェン投与後の大腿骨から段階的なコラゲナーゼ処理によって骨細胞様細胞を単離した。得られた骨細胞様細胞の CCN2 遺伝子の発現量の減少を確認した後、コラーゲンゲル内で3次元培養し、そのゲル上に RAW264.7 細胞を播種した。次いで GST-RANKL 刺激後、c-FOS 及びカテプシン K の産生量を調べた結果、CCN2 の発現が減少した骨細胞様細胞上で GST-RANKL によって破骨細胞形成を誘導した RAW264.7 細胞においては対照群と比べてそれらの産生量の減少が見られた。これらの結果は CCN2 発現の減少した骨細胞様細胞では前駆細胞の破骨細胞分化の誘導能が低下していることを示唆しており、我々が MLO-Y4 細胞を用いて CCN2 の機能を示した昨年の本学会の結果と一致する。さらに、タモキシフェン誘導性 CCN2 欠損マウス大腿骨の組織切片を観察すると、二次海綿骨梁の減少が見られた。この組織学的所見と CCN2 遺伝子の発現が減少した骨細胞様細胞における破骨細胞低形成能から、リモデリング期での CCN2 の発現低下が骨細胞機能の低下を引き起こし、その結果によって生じた骨形成と骨吸収のバランスの破綻が二次海綿骨の骨梁の減少を招いた可能性が考えられた。会員外共同研究者：横井秀基（京都大学大学院医学研究科 腎臓内科）、向山政志（熊本大学大学院生命科学部 腎臓内科）

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Osteoclast forming potential of osteocyte-like cells derived from tamoxifen-induced CCN2 deficient mice

○Nishida T¹, Kubota S^{1,2}, Takigawa M²

¹Dept Biochem Mol Dent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

²Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

In the last meeting, we reported that GST-RANKL-induced osteoclastogenesis of a mouse macrophage cell line, RAW264.7 was promoted by a mouse osteocytic cell line MLO-Y4 embedded in collagen gel including recombinant CCN2 (rCCN2). In this study, we verified this result by a different approach. Firstly, we generated tamoxifen-induced *Ccn2*-deficient mice and isolated osteocyte-like cells by a serial treatment with collagenase from femur of the mice after injection of tamoxifen. After confirming that the gene expression of *Ccn2* was decreased, we constructed 3D culture of these cells with collagen gel. RAW264.7 was inoculated onto the gel and was treated with GST-RANKL. Production of c-FOS and cathepsin K, which were essential factors for osteoclast formation, was decreased in RAW264.7 cells on the gel including *Ccn2*-deficient osteocyte-like cells. These results suggest the inability of *Ccn2*-deficient osteocyte-like cells in osteoclastogenesis of RAW264.7 cells. Furthermore, histological analysis of *Ccn2*-deficient femur revealed that the numbers of secondary trabecular bone were decreased. Taken together with these findings in this study, it was suggested that *Ccn2*-deficiency during bone remodeling induced the unbalance of bone formation and resorption, leading to the decreased trabecular bone in *Ccn2*-deficient femur. (Non-member co-authors; Drs. Yokoi, H. and Mukoyama, M.)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D23 新規アクチン結合分子 PPP1r18 は破骨細胞のアクチンリング形成を阻害する

○松原 琢磨¹, 中富 千尋¹, 古株彰一郎¹, 山本 照子², 自見英治郎¹

¹九歯大 分子情報生化

²東北大 院歯 顎口腔矯正

【背景・目的】大理石骨病を呈するチロシンキナーゼ c-Src 遺伝子欠損マウスの破骨細胞は骨基質と強固に接着する明帯および骨吸収に重要な構造である波状縁を形成できず、骨吸収できない。*in vitro* において破骨細胞は、アクチンがドット状に凝集したポドソームが細胞膜に沿ったリング状構造（アクチンリング）を形成する。c-Src 遺伝子欠損マウス由来の破骨細胞はアクチンリングを形成しないことなどから、このアクチンリングの形成は骨吸収と相関することが知られている。そのため、アクチンリング形成の制御機構を解明することは、歯周病や骨粗鬆症をはじめとした代謝性骨疾患の治療法の確立にもつながると考えられる。そこで、まず我々は、c-Src 遺伝子欠損した線維芽細胞株 SYF に恒常活性化型 c-Src (ca-Src) を遺伝子導入し、質量分析を行うことにより ca-Src と会合するタンパク質の 1 つとして機能的に未知なアクチン結合タンパク質 PPP1r18 を見出した。そこで、本研究では破骨細胞のアクチンリング形成における PPP1r18 の機能を検討した。【方法・結果】マウス骨髄細胞を M-CSF および RANKL で刺激し、破骨細胞を分化誘導すると PPP1r18 の発現は、破骨細胞の分化に伴ない減少した。RAW264.7 細胞またはマウス骨髄より分化誘導した破骨細胞様細胞に PPP1r18 の shRNA を作用させると、アクチンリングを有する TRAP 陽性多核細胞の割合が増加していた。一方、PPP1r18 を過剰発現させると、アクチンリングを有する TRAP 陽性多核細胞の割合は減少していた。【結論】PPP1r18 は破骨細胞のアクチンリング形成を負に制御し、アクチンリングのターンオーバーに重要であることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

PPP1r18 negatively regulates actin ring formation in osteoclasts

○Matsubara T¹, Nakatomi C¹, Kokabu S¹, Yamamoto T², Jimi E¹

¹Div Mol Signal and Biochem, Kyushu Dent Univ

²Div Orthod Dentofac Orthop, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Actin ring, a unique actin structure in osteoclasts *in vitro* plays important role in osteoclastic bone resorption. Osteoclasts derived from c-Src deficient mice that show osteopetrosis does not have actin ring and little resorb bone. Actin ring is consisted with dot-like actin accumulated structure named podosomes. Constitutively activated c-Src (caSrc) made c-Src null fibroblasts (SYF cells) podosomes formation. To reveal the actin regulatory molecule for caSrc-induced podosome formation, we analyzed the binding protein of c-Src in caSrc transfected SYF cells by mass spectrum analysis and identified an actin binding protein PPP1r18. PPP1r18 was expressed and strictly localized in podosome of osteoclast actin ring although expression level was decreased with osteoclastogenesis. Knock down of PPP1r18 with shRNA in RAW264.7 cell and osteoclasts from bone marrow induced actin ring formation. On the other hand, overexpression of PPP1r18 in osteoclasts inhibited actin ring formation. These data suggest that PPP1r18 may act as negative regulator of actin ring formation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D24 Wnt5a-Ror2 シグナルは Rho-Pkn3-c-Src 経路を介して破骨細胞の骨吸収活性を制御する

○上原 俊介¹, 山下 照仁², 宇田川信之¹, 高橋 直之², 小林 泰浩²

¹松歯大 口腔生化

²松歯大 総歯研

【背景】我々は、破骨細胞の骨吸収機能における Wnt5a-Ror2 シグナルの役割を明らかにするため、破骨細胞特異的 Ror2 欠損 (Ror2 cKO) マウスを解析し、骨吸収機能の低下により骨量が増加していることを明らかにした。さらに、Ror2 の下流で Rho が活性化されること、Rho エフェクターである Protein kinase N3 (Pkn3) が破骨細胞に高発現することを見出した。しかし、破骨細胞の骨吸収機能における Pkn3 の役割は不明である。【方法と結果】Pkn3 欠損 (Pkn3 KO) マウスの骨をマイクロ CT により解析したところ、骨量が増加していた。骨形態計測により、破骨細胞数には差が無いが、吸収面が少ないことが明らかとなった。血清骨吸収マーカーである CTX は Pkn3 KO マウスで低下していた。骨形成パラメーターには差が無かったことから、Pkn3 KO マウスは骨吸収の低下により骨量増加を呈すると考えられる。Pkn3 KO 由来の破骨細胞の培養では、アクチンリング形成および吸収窩形成が低下していた。この培養破骨細胞にアデノウイルスを用いて、野生型 Pkn3 を発現すると吸収窩形成は回復した。一方、プロリンリッチ領域 (PRR) を欠損した Pkn3 を発現しても回復しなかった。免疫沈降法により、Pkn3 が Ror2 シグナル依存的に c-Src と結合すること、その結合に PRR が必要であることが明らかとなった。Ror2 cKO 破骨細胞では c-Src のキナーゼ活性が低下した。Ror2 cKO または Pkn3 KO 破骨細胞に恒常活性型 c-Src を発現するとアクチンリング形成および吸収窩形成は回復した。【考察】以上の結果から、Wnt5a-Ror2 シグナルは、Rho-Pkn3-c-Src 経路を介して、破骨細胞の骨吸収活性を正に制御していると結論した。【利益相反】利益相反状態にはありません。

Wnt5a-Ror2 signaling regulates bone-resorbing activity of osteoclasts through Rho-Pkn3-c-Src pathways

○Uehara S¹, Yamashita T², Udagawa N¹, Takahashi N², Kobayashi Y²

¹Dept Oral Biochem, Matsumoto Dent Univ

²Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ

Using osteoclast-specific Ror2 conditional knockout (Ror2 cKO) mice, we have previously shown that Wnt5a-Ror2 signaling regulates bone-resorbing activity of osteoclasts through the activation of Rho. In addition, we revealed that protein kinase N3 (Pkn3), a Rho effector, was highly expressed in osteoclasts. However, roles of Pkn3 in the functions of osteoclasts remain unclear. To clarify this issue, we analyzed bone phenotypes of Pkn3 knock-out (KO) mice. Micro CT analysis and bone histomorphometric analysis revealed that Pkn3 KO mice had a high bone mass due to impaired bone-resorbing activity. Osteoclasts formed from bone marrow cells of Pkn3 KO mice failed to resorb bone due to a defect of actin ring formation. Overexpression of wild-type Pkn3 rescued bone-resorbing activity of Pkn3 KO osteoclasts, but not proline-rich region-deletion mutant of Pkn3 (Δ PRR-Pkn3). Immunoprecipitation assay revealed that wild-type Pkn3 bound to c-Src in a Ror2 dependent manner; however, Δ PRR-Pkn3 did not. The kinase activity of c-Src in Ror2 cKO osteoclasts was lower than that in control osteoclasts. Overexpression of constitutively active c-Src rescued the impaired bone-resorbing activity of both Ror2 cKO and Pkn3 KO osteoclasts. These results suggest that Wnt5a-Ror2 signaling regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts through Rho-Pkn3-c-Src pathways.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D25 病的に活性化された破骨細胞：形成条件の検討と蛍光プローブを用いた骨吸収イメージング

○白鳥 卓麻^{1,3}, 久木田明子², 上原 範久¹, 久本由香里¹, 張 旌旗¹, 山座 孝義¹, 古谷野 潔³, 久木田敏夫¹

¹九大 院歯 分子口腔解剖

²佐賀大 医 微生物

³九大 院歯 インプラント

【目的】正常破骨細胞ではほぼ検出されない CSF-1 受容体が病的骨破壊をおこす破骨細胞では高発現すること、関節炎マウスでは膜抗原 Ly6C を発現する前駆細胞が病的骨破壊をおこす破骨細胞に分化することが報告されており、病的骨破壊をおこす破骨細胞は正常な破骨細胞とは異なるポピュレーションを形成している可能性がある。病的環境下に形成された破骨細胞に特異的または選択的に発現する分子を特定出来れば、病的な骨破壊を起こす破骨細胞のみを制御することが可能になる。今回、病的に活性化された破骨細胞を誘導する条件を検討するとともに、蛍光プローブを用いた骨吸収イメージングを行った。更に正常な破骨細胞の機能発現に必須なインテグリン活性化分子 Kindlin-3 の病的骨破壊への関与についても検討した。【方法】各種炎症性サイトカインをマウス骨髄細胞を用いた破骨細胞分化系に添加、培養後、象牙質片に再播種し同一条件下で骨吸収させた。SEM による解析とともに酸感受性蛍光プローブを用いた骨吸収イメージングと定量化を行った。ウエスタンブロッティングにより Kindlin-3 の発現を検討した。【結果】IL-1 β 存在下で形成された破骨細胞が顕著に高い骨吸収活性を有することがわかった。更に、酸感受性蛍光プローブを吸着させた象牙質片を用いて活性化のイメージング解析を行った。酸感受性蛍光プローブを用いた骨吸収イメージング解析により IL-1 β 存在下で形成された破骨細胞は無刺激の破骨細胞に比べ明らかに多量のプロトン (H⁺) を象牙質片表面に向けて遊離することがわかった。IL-1 β 添加による kindlin-3 の顕著な発現低下を認めた。【結論&考察】IL-1 β 存在下で形成された破骨細胞に顕著な機能亢進を認めた。正常な破骨細胞とは異なるポピュレーション、すなわち「病的活性化破骨細胞」である可能性が強く示唆された。非会員共同研究研究者:東大 薬 薬品代謝化学/医 生体情報分野 浦野泰照 神谷真子 国府田絹子
【利益相反】利益相反状態にはありません。

Are osteoclasts induced in the presence of inflammatory cytokines related to the pathologically activated osteoclasts ?

○Shiratori T^{1,3}, Kukita A², Uehara N¹, Kyumoto Y¹, Zhang JQ¹, Yamaza T¹, Koyano K³, Kukita T¹

¹Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Microbiol, Fac Med Saga Univ

³Sect Implant Rehabil Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Purpose: Osteoclasts causing pathological bone destruction may constitute sub-populations different from normal osteoclasts mediating normal bone remodeling. Identification of the molecules specifically or selectively expressed in osteoclasts formed under the pathological environments could lead to realize the specific regulation of pathological bone destruction. In the current study, we investigated culture conditions that induce the pathologically, activated osteoclasts by estimating the image of bone resorption using the acid-sensitive fluorescence probe. We have also examined a possible involvement of Kindkin-3, the essential integrin for normal osteoclast differentiation, in pathological bone destruction. **Materials & Methods:** Osteoclasts were formed in the presence of various inflammatory cytokines by use of mouse bone marrow cells. Activity of osteoclasts was analyzed by use the SEM. Bone resorption imaging was traced and quantified using acid-sensitive fluorescence probes. **Results & Conclusion:** Osteoclasts formed in the presence of IL-1 β expressed the highest bone resorption activity. In addition, by the imaging analysis using a acid-sensitive fluorescence probe, we have detected a large amount of protons secreted from osteoclasts formed in the presence of IL-1 β . Expression of kindlin-3 was significantly suppressed by the addition of IL-1 β . Osteoclasts formed in the presence of IL-1 β could be the pathologically activated osteoclasts.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

O2-D26 Galectin-9 による破骨細胞分化抑制因子 MafB の発現制御

○久本由香里¹, 上原 範久¹, 久木田明子², 山座 孝義¹, 久木田敏夫¹

¹九大 院歯 分子口腔解剖

²佐賀大 医 微生物

【目的】 Galectin-9 は、ガラクトースに対する結合特異性を有するタンデムリピートタイプのレクチンであり、好酸球や好中球、NK 細胞に対する走化性因子として作用することにより免疫応答や炎症を制御する。我々はこれまでに、Galectin-9 がアジュバント誘導性関節炎ラットにおける骨破壊を顕著に抑制すること、また Galectin-9 が破骨細胞分化を抑制し、そのメカニズムとして NFATc1 の機能を抑制する転写因子 MafB の発現制御が関与する可能性を報告してきた。そこで本研究では、破骨細胞における Galectin-9 シグナルと MafB 制御の詳細なメカニズムを解析した。

【方法】 細胞株である RAW-D 細胞及びマウス骨髄細胞 (mBMMs) を用いた破骨細胞分化系において、Galectin-9 受容体である Tim-3 の発現をリアルタイム PCR 法及びフローサイトメトリーを用いて検討した。また、mBMMs を Galectin-9 による前処理後にタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドの存在下、RANKL で各時間刺激し、MafB タンパク質の分解に対する Galectin-9 の効果をウエスタンブロッティング法により検討した。さらに、Tim-3 の下流で MafB 上流にある STAT 経路の活性化に対する Galectin-9 の影響を同様に解析した。【結果】 培養破骨前駆細胞には Tim-3 が発現し、それは RANKL 刺激前より高い発現を示すことを確認した。MafB タンパク質は RANKL 刺激により短時間で分解されるが、Galectin-9 を曝露しても MafB 分解に影響は認められなかった。しかしながら、Galectin-9 曝露により STAT3 リン酸化が著明に亢進することが明らかとなった。【考察】 以上の結果から、Galectin-9 は Tim-3 を介した転写因子 STAT3 の活性化を経て MafB の発現を誘導し、破骨細胞分化を負に制御する可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Regulation of the expression of MafB, an osteoclastogenesis inhibitor, by galectin-9

○Kyumoto Y¹, Uehara N¹, Kukita A², Yamaza T¹, Kukita T¹

¹Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Microbiol, Fac Med Saga Univ

Galectins consist a unique family of lectins that have the ability to bind molecules having β -galactoside-containing carbohydrates. Galectin-9, a tandem repeat type of galectin, was originally identified as a chemotactic factor for eosinophils and natural killer cells, and is also involved in the regulatory process of immune response and inflammation. We have reported that injection of galectin-9 into rats with adjuvant-induced arthritis significantly suppressed bone destruction, and that galectin-9 markedly inhibited the formation of TRAP positive multinuclear osteoclasts from primary murine bone marrow macrophages (mBMMs) through down-regulating NFATc1 by inducing suppressive transcription factor MafB. Here, we examined the mechanism of induction of MafB through galectin-9 signaling in osteoclasts. Tim-3, a transmembrane protein that acts as the specific receptor for galectin-9, was expressed in osteoclast precursors. RANKL stimulation tended to down-regulate the expression of Tim-3 on the surface of osteoclast precursors. MafB protein was degraded by RANKL stimulation in a short period of time, however, galectin-9 exposure did not inhibit MafB degradation in mBMMs. Treatment of galectin-9 induced significant phosphorylation of STAT3, an activator of MafB transcription. These results suggest that galectin-9 negatively regulates osteoclastogenesis by maintaining MafB expression through the activation of STAT3 signaling by use of galectin-9 /Tim-3 system.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-1 唾液腺の形態形成における性差と Runx1 の制御機構について

○小野 瞳¹, Sarper Safiye², 山城 隆², 阪井 丘芳¹

¹阪大 院歯 顎治

²阪大 院歯 矯正

【目的】性ホルモンの生理的役割や臓器形態形成の性差を理解することは、男女それぞれに好発する疾病の予防や治療戦略を立てる上で重要である。唾液腺疾患の罹患には性差があり、性ホルモンと唾液分泌能の関係が示唆されているが詳細な分子機序は不明な点が多い。本研究は性ホルモンと関与が示唆される Runx1 に注目し、唾液腺の形態形成にアンドロゲンが関わる役割を検討した。【方法】WT マウス唾液腺における Runx1 の局在を免疫組織染色と in situ hybridization 法で確認した。また Runx1 を上皮特異的に欠損させたマウス (Runx1cKO) および、性器を摘出したマウスを作成し検討を行った。機能学的解析として M3 受容体刺激による唾液分泌量測定を行い、作成した Runx1cNO と WT との比較を行った。また HE 染色と免疫組織染色による形態学的解析および、リアルタイム RT-PCR を用いた唾液腺マーカーの遺伝子発現を検討した。さらにアンドロゲンと形態形成の分子機構を解明するため、血中ホルモン測定および RT-PCR を用いたアンドロゲン依存的なマーカー *Crisp3* の解析を行った。【結果】Runx1 は顎下腺の導管、特に細胞増殖因子を分泌する顆粒性導管に強く発現していた。また Runx1cKO の成体雄マウスでは唾液分泌量の低下を認め、免疫組織染色で水チャネル AQP5 の局在に変化が認められた。形態学的比較において Runx1cKO では顆粒性導管の割合が顕著に減少しており、それに伴う細胞増殖因子 *Egf*, *Ngf* の発現低下が認められた。胎生期、二次性徴前の雄マウスや成体雌マウスでは異常は認められなかった。さらに、Runx1cKO の雄マウスでは血中アンドロゲンに変化はないが、唾液腺組織中の *Crisp3* の遺伝子発現が低下していた。【考察】Runx1cKO における唾液腺の機能的低下および導管形成不全を認めたことから、唾液腺の導管形成は二次性徴のアンドロゲン依存的に制御され、Runx1 が導管形成および分化に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The role of Runx1 in the salivary gland morphogenesis

○Ono H¹, Sarper S², Yamashiro T², Sakai T¹

¹Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

Here we address dominant roles of Runx1 in androgen-dependent sexual dimorphism in the SMG. Runx1 was specifically distributed in the duct basal cells of the SMG. Runx1 deficient male mouse exhibited involution of GCT in SMG with downregulated expression of *Ngf* and *Egf*, its marker genes and *Crisp3*, an androgen-dependent transcript. Circulating testosterone levels were not affected in the mutant, indicating that the duct phenotypes could be direct effect of epithelial Runx1 deficiency. Such salivary gland phenotypes are not evident in the female mutant SMG or in prepubertal mutant SMG at P17. These salivary phenotypes are analogous to that of *Cbfb*, indicating that dominant partner of *Cbfb* is Runx1. On the other hand, saliva flow rates were decreased in the mutant male mice. In the mutant male SMG, expression of Aquaporin 5 (Aqp5), the main water channel protein, were not deviated, however, aberrant shape of AQP5-immunoreactive protein were abundantly stuck in the cytoplasm of the mutant acini. Such findings were male specific but independent to androgen-pathway, because ORX acini did not demonstrate such findings. Thus, Runx1-Cbfb signaling is involved in the sexual dimorphism in SMG.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-2 胎生期マウス外側翼突筋停止部における付着様式の獲得

○永倉遼太郎, 北村 啓, 山本 将仁, 松永 智, 阿部 伸一
東歯大 解剖

【目的】外側翼突筋は顎関節に付着し、顎運動を担う重要な筋である。その外側翼突筋の骨への付着部位では筋から腱、そして骨へと移行するが、その形態がどのように獲得されていくかについては不明な点がある。そこで今回、外側翼突筋停止部を研究対象とし、その部位を『筋・腱・骨複合体』として1つの機能的単位として捉え、胎生期に発生起源の異なる3つの組織が結合し、動力機能を得るメカニズムの一端を解析することを目的とした。【方法】試料はICR系マウス(胎生12日~16日)を用いた。通法に従い連続切片を作製し、各種染色を行った。外側翼突筋と下顎頭の付着形態を観察する為にマッソントリクローム染色を行った。また、形態学的観察を元に抗デスミン抗体を用いた免疫組織化学的染色、さらにはアルカリフォスファターゼを用いた酵素組織化学的染色を行い、初期の筋と骨の発達を観察した。【結果と考察】デスミンは胎生12日から将来の筋-腱接合部に集積し始め、外側翼突筋の発達と同時に筋線維全体に広がっていき、その傾向は胎生16日まで変わらなかった。胎生14日において外側翼突筋の筋-腱接合部が下顎頭軟骨の前方と上方を取り囲むように位置しているのが認められた。胎生15日では腱組織が明瞭に認められるようになった。胎生16日から下顎頭は上方に著しく成長し、外側翼突筋の走行方向が前上方から前下方に変化した。したがって、筋、腱、骨という組織単体の成長に加え、器官形成による相互作用が急速な成長を促すことが示唆された。また、胎生14日~16日の筋腱接合部が下顎頭の上方に存在するのは、今後出現する関節円板と外側翼突筋が接合する準備をしている為であると考えられた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Acquisition of the attachment pattern of the lateral pterygoid muscle insertion in embryonic mice

○Nagakura R, Kitamura K, Yamamoto M, Matsunaga S, Abe S
Dept Anat, Tokyo Dent Coll

Using the lateral pterygoid muscle insertion of embryonic mice, this region was regarded as a functional unit, the 'muscle-tendon-bone complex', and its developmental process was investigated. ICR mice at embryonic days 12-16.0 were used for morphological observations of the lateral pterygoid muscle insertion. Sagittal sections were prepared, and then stained with masson trichrome stain. Additionally, we utilized double staining comprising combination of enzyme histochemistry of alkaline phosphatase and immunohistochemical staining for desmin. Muscle-specific protein, desmin, started to accumulate in the region corresponding to the future muscle-tendon junction from 12 embryonic days and spread over the entire muscle fibers with the development of the lateral pterygoid muscle. Formation of the mandibular head progressed in the same period, and overall formation of the muscle, tendon, and bone was observed. It was suggested that the muscle, tendon, and bone do not independently mature in the region of muscle attachment to bone, but they mature as a unit and there may be a specific factor inducing the maturation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-3 筋再生過程における Tcf4 の役割

○小川 雄大, 小高 研人, 山本 将仁, 松永 智, 阿部 伸一
東歯大 院歯 解剖

【目的】筋線維および筋線維周囲結合組織に存在する転写因子である Tcf4 は、骨格筋の発生および成熟に重要な役割を担っている事が知られている。近年、この Tcf4 が筋線維タイプの決定因子であり、遅筋線維と速筋線維への分化にも関与する可能性が示唆された。さらに筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスの筋再生過程において、Tcf4 が筋再生領域にて多量に発現している傾向が示された。この事から Tcf4 は筋の発生のみならず、筋の再生にも重要な役割を担う可能性が考えられるが、実験的筋損傷による筋再生過程における Tcf4 の発現と筋組織内における局在に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、実験的に骨格筋を損傷させ、その再生過程における Tcf4 の発現に関して免疫組織化学的検索を試みた。【方法】試料は ICR 系マウス(成獣)を用いた。全身麻酔下にて咬筋部皮膚切開し筋膜上で剥離し咬筋を露出させ、液体窒素にて冷やした探針を咬筋に 10 秒刺入させて人工的に凍傷を起こさせた。筋損傷後、6 時間、1 日、3 日、7 日でそれぞれ屠殺し、通法に従い凍結切片を作成した。形態学的観察のため H-E 染色を、タンパクの局在を検索するため免疫組織化学的染色を施した。【結果および考察】損傷後 6 時間から 1 日、筋線維に通常みられる多角形構造が喪失していた。また筋線維間結合組織に Tcf4 が多く集積していた。損傷 3 日後、筋線維間結合組織において炎症性細胞の浸潤が最も顕著に認められ、Tcf4 も同部位にて顕著に観察できた。損傷 7 日後、炎症性細胞と損傷した筋線維の数は減少した。また筋線維間結合組織の Tcf4 の数も減少傾向がみられた。したがって、筋再生過程において筋線維の修復に Tcf4 が重要な役割を担っていると考えられ、また、炎症性細胞と Tcf4 の集積のピークの時期が近似していることから炎症性細胞の発現と Tcf4 の発現の関連が考えられた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Immunohistochemistry of Tcf4 expression during muscle regeneration

○Ogawa Y, Odaka K, Yamamoto M, Matsunaga S, Abe S
Dept Anat, Tokyo Dent Coll

Muscle and its connective tissue are intimately linked in the embryo and in the adult, suggesting that interactions between these tissues are crucial for their development. However, the study of muscle connective tissue has been hindered by the lack of molecular markers and genetic reagents to label connective tissue fibroblasts. The present study was conducted to clarify the changes of the tissue and cell during the healing process of skeletal muscle damage by evaluating the distribution of Tcf4. The ICR mouse masseter was experimentally injured to examine Tcf4 expression during its healing. At 6 hours after the muscle injury, Tcf4 accumulated in the connective tissue between the muscle fibers. On Day 3, regenerated muscles with central nuclei were noted in the connective tissue between the muscle fibers, with a large amount of Tcf4 expressed around the regenerated immature muscles. On Day 7, the regenerated muscle increased in size, with a decrease in Tcf4 expression. Thus, Tcf4 may play an important role in repairing muscle fibers during muscle regeneration. In addition, the peak of inflammatory cell accumulation almost coincided with that of Tcf4, suggesting that Tcf4-positive cells are induced by inflammatory cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-4 TRPV4 チャンネルを介した温度変化による口腔上皮細胞調節

○吉本 怜子^{1,2}, 合島怜央奈⁴, 大崎 康吉³, 曹 愛琳³, 張 旌旗³, 清島 保², 城戸 瑞穂⁴

¹九大 院歯 歯周

²九大 院歯 口腔病理

³九大 院歯 分子口腔解剖

⁴佐賀大 医 組織・神経解剖

上皮は外界からの幅広い温度変化に常に曝されている。近年、温度感受性のイオンチャンネル transient receptor potential channel (TRP チャンネル) 群が温度受容を担い、多様な生理機能に関わっている事が次々と明らかになってきた。なかでも、27~32°C という体表温付近の温度で活性化する TRP vanilloid 4 (TRPV4) が皮膚や粘膜上皮などに発現し、上皮バリアに関わる事が報告されてきた。そこで我々は、生理的な温度変化が口腔上皮のバリア機能、特に細胞間接着構造に与える影響を明らかにする事を目的として実験を行った。新生仔マウス口蓋粘膜上皮細胞の初代培養を行った。培養開始後 3~5 日目に CaCl₂ 含有培地に交換し、TRPV4 の活性化温度を想定して 31°C と 37°C で 24 時間培養したのちパラホルムアルデヒドで固定し、免疫組織化学的手法を用いて細胞骨格および細胞間接着関連タンパクを染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。蛍光標識 Phalloidin を用いた染色によると、37°C ではサイズの大きい細胞が多く、細胞同士が接着し細胞膜直下のアクチンリングの形成が顕著であった。一方 31°C では細胞膜の突出部である filopodia や stress fiber にアクチンが多く観察された。Adherens junction 構成タンパクの 1 つである E-cadherin には、37°C では細胞間に線状に認められたのに対し、31°C では細胞間隙が明らかで、filopodia の先端に点状もしくはヒゲ状に発現していた。また、TRPV4 が adherens junction タンパクと直接相互作用することに着目し、TRPV4 遺伝子欠失マウスと野生型それぞれから採取した細胞の形態を比較したところ、TRPV4 遺伝子欠失マウスの細胞は stress fiber の発達が顕著であり、細胞間接着部における E-cadherin の発現は弱く点状であった。以上より、温度は口腔上皮細胞の大きさや細胞間接着を制御しており、TRPV4 が関与することが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Temperature change affects oral epithelial cells via TRPV4 channel

○Yoshimoto R^{1,2}, Aijima R⁴, Ohsaki Y³, Cao A³, Zhang J³, Kiyoshima T², Kido M⁴

¹Sect Periodontol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Oral Pathol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

³Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

⁴Dept Anat and Physiol, Saga Med Sch

Oral epithelia are constantly exposed to wide range of external temperatures. Recently, transient receptor potential (TRP) channels have been shown to perceive thermal stimuli and participate in various physiological functions. TRP vanilloid 4 (TRPV4), activated in 27-32°C was reported to be involved in barrier functions in skin epithelia. We here aimed to find the effect of physiological temperature changes on oral epithelial barrier function and intercellular adhesion. Primary-cultured mice oral epithelial cells were stimulated with media containing CaCl₂ at 3-5 days of culture, and placed at the temperature of 31 or 37°C for 24 h. Cells were then fixed with paraformaldehyde, and stained by immunocytochemistry for cytoskeletal or adhesion molecules. More large-sized cells were found at 37°C than 31°C. Fluorescent phalloidin labeled F-actin showed prominent actin ring at cell-cell contacts at 37°C, whereas cells at 31°C showed prominent filopodia and stress fibers with actin labeling. E-cadherin, an important member of adherens junction complex, showed linear pattern at cell-cell contact at 37°C, but punctate profiles with intercellular protrusions at 31°C. Cells from TRPV4-gene deficient mice had more developed stress fibers and weaker expression of E-cadherin compared to wild-type. Warmer temperature is suggested to strengthen cell-cell contact in oral epithelia via TRPV4.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-5 ラット三叉神経節における TRPC の発現

○藤田 雅俊¹, 佐藤 匡², 矢島 健大², 市川 博之²

¹東北大 院歯 麻酔

²東北大 院歯 口腔器官構造

transient receptor potential cation channel subfamily C (TRPC) はカルシウムイオン透過型非選択性陽イオンチャネルで、様々なタンパク質と結合したり、TRPC ファミリー内においてヘテロマルチマーを形成する。その蛋白質との組み合わせによって細胞内局在、シグナル制御特性などを調節していると考えられている。TRPC の分布や機能は、その subtype により異なっているが、中枢神経系において重要な役割を担っていることが報告されているが、末梢神経系における報告は比較的少ない。本研究では、三叉神経系における感覚ニューロンでの TRPC の機能を明らかにするために、免疫染色により TRPC1, 3, 4 の分布を三叉神経節において検討した。ラット三叉神経節では TRPC1 は主に小型のニューロンに強い免疫反応が認められた。TRPC3 は、小型から大型までさまざまな大きさのニューロンに観察されたが、一部の大型ニューロンには反応が認められなかった。一方、TRPC4 は、主に小型から中型のニューロンが免疫反応を示していた。免疫蛍光2重染色法によりこれらのニューロンの一部では calcitonin gene-related peptide (CGRP) と共存していることが明らかとなった。TRPC1, 4 は衛星細胞にも強い反応が認められた。また、今回調べた全ての TRPC は、シュワン細胞にも免疫反応が観察された。以上の結果から、三叉神経節においては感覚ニューロン、衛星細胞、シュワン細胞で TRPC が機能を有していることが示唆された。感覚ニューロンにおいては CGRP との共存から侵害情報の伝達に参与している可能性も考えられる。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Expression of TRPC in the rat trigeminal ganglion

○Fujita M¹, Sato T², Yajima T², Ichikawa H²

¹Div Dent Anesthesiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent Med

²Div Oral Craniofac Anat, Tohoku Univ Grad Sch Dent Med

TRPC belongs to the family of transient receptor potential cation channels which are nonselective monovalent cation channels and also allow passage of Ca^{2+} . This family is associated with membrane depolarization and mediation of sustained increases of intracellular Ca^{2+} . In the brain, distribution TRPC has been reported. However, little is known about TRPC in the peripheral nervous system. In this study, immunohistochemistry for TRPC1, 3, 4 was performed on the rat trigeminal ganglion (TG). In the TG, TRPC1 was mainly expressed by small neurons. Sensory neurons with various cell body sizes contained TRPC3-immunoreactivity, whereas small to medium-sized neurons showed TRPC4-immunoreactivity. A double immunofluorescence method revealed co-expression of TRPC with calcitonin gene-related peptide (CGRP), a marker for small and medium-sized nociceptors. Satellite cells were immunoreactive for TRPC1 and 4, and Schwann cells also contained TRPC1, 3, 4-immunoreactivity. It is likely that TRPC has a function in sensory neurons, satellite cells and Schwann cells. Co-expression of TRPC with CGRP may suggest that TRPC1, 3, 4 are associated with nociceptive transduction in the TG.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-6 Galectin-9 による破骨細胞分化抑制因子 MafB の発現制御

○久本由香里¹, 上原 範久¹, 久木田明子², 山座 孝義¹, 久木田敏夫¹

¹九大 院歯 分子口腔解剖

²佐賀大 医 微生物

【目的】 Galectin-9 は、ガラクトースに対する結合特異性を有するタンデムリピートタイプのレクチンであり、好酸球や好中球、NK 細胞に対する走化性因子として作用することにより免疫応答や炎症を制御する。我々はこれまでに、Galectin-9 がアジュバント誘導性関節炎ラットにおける骨破壊を顕著に抑制すること、また Galectin-9 が破骨細胞分化を抑制し、そのメカニズムとして NFATc1 の機能を抑制する転写因子 MafB の発現制御が関与する可能性を報告してきた。そこで本研究では、破骨細胞における Galectin-9 シグナルと MafB 制御の詳細なメカニズムを解析した。

【方法】 細胞株である RAW-D 細胞及びマウス骨髄細胞 (mBMMs) を用いた破骨細胞分化系において、Galectin-9 受容体である Tim-3 の発現をリアルタイム PCR 法及びフローサイトメトリーを用いて検討した。また、mBMMs を Galectin-9 による前処理後にタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドの存在下、RANKL で各時間刺激し、MafB タンパク質の分解に対する Galectin-9 の効果をウエスタンブロッティング法により検討した。さらに、Tim-3 の下流で MafB 上流にある STAT 経路の活性化に対する Galectin-9 の影響を同様に解析した。【結果】 培養破骨前駆細胞には Tim-3 が発現し、それは RANKL 刺激前より高い発現を示すことを確認した。MafB タンパク質は RANKL 刺激により短時間で分解されるが、Galectin-9 を曝露しても MafB 分解に影響は認められなかった。しかしながら、Galectin-9 曝露により STAT3 リン酸化が著明に亢進することが明らかとなった。【考察】 以上の結果から、Galectin-9 は Tim-3 を介した転写因子 STAT3 の活性化を経て MafB の発現を誘導し、破骨細胞分化を負に制御する可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Regulation of the expression of MafB, an osteoclastogenesis inhibitor, by galectin-9

○Kyumoto Y¹, Uehara N¹, Kukita A², Yamaza T¹, Kukita T¹

¹Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Microbiol, Fac Saga Med Univ

Galectins consist a unique family of lectins that have the ability to bind molecules having β -galactoside-containing carbohydrates. Galectin-9, a tandem repeat type of galectin, was originally identified as a chemotactic factor for eosinophils and natural killer cells, and is also involved in the regulatory process of immune response and inflammation. We have reported that injection of galectin-9 into rats with adjuvant-induced arthritis significantly suppressed bone destruction, and that galectin-9 markedly inhibited the formation of TRAP positive multinuclear osteoclasts from primary murine bone marrow macrophages (mBMMs) through down-regulating NFATc1 by inducing suppressive transcription factor MafB. Here, we examined the mechanism of induction of MafB through galectin-9 signaling in osteoclasts. Tim-3, a transmembrane protein that acts as the specific receptor for galectin-9, was expressed in osteoclast precursors. RANKL stimulation tended to down-regulate the expression of Tim-3 on the surface of osteoclast precursors. MafB protein was degraded by RANKL stimulation in a short period of time, however, galectin-9 exposure did not inhibit MafB degradation in mBMMs. Treatment of galectin-9 induced significant phosphorylation of STAT3, an activator of MafB transcription. These results suggest that galectin-9 negatively regulates osteoclastogenesis by maintaining MafB expression through the activation of STAT3 signaling by use of galectin-9 /Tim-3 system.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-7 Receptor activator of NF κ B ligand (RANKL)によるマウス気管・気管支上皮からのM細胞分化誘導

○武藤 麻未¹, 木村 俊介², 吉沢 早織¹, 岩永 敏彦², 飯田順一郎¹

¹北大 院歯 矯正

²北大 院医 組織細胞

消化器と呼吸器を覆う粘膜は免疫機構が発達する。各所のリンパ濾胞では抗原は上皮を介して取り込まれる。従って濾胞上皮は粘膜免疫で機能するリンパ性器官の構成要素の一つである。濾胞上皮のM細胞は管腔内抗原の取り込みに働く。近年、腸管パイエル板におけるM細胞研究が進み、粘膜免疫応答におけるM細胞の重要性が再認識されている。一方で呼吸器粘膜におけるM細胞研究は進んでいない。本研究ではマウスへのReceptor activator of NF κ B ligand (RANKL)が気管・気管支上皮にM細胞を誘導することを見出したので報告する。C57BL/6系統もしくはBALB/c系統のマウス腹腔内へRANKLを投与した後に気管・気管支上皮の組織切片を作成し免疫組織化学的解析を行った。その結果、腸管M細胞発現分子であるGlycoprotein 2(GP2), Tnfaip2両陽性細胞の出現が認められた。GP2抗体による免疫電子顕微鏡観察ではこの細胞は無線毛上皮であり、以前我々が報告したマウスの鼻咽頭関連リンパ組織に存在するM細胞と形態的特徴が一致した。さらに、経鼻投与したラテックスビーズがこの細胞から取り込まれたことから、気道M細胞であると結論づけた。気管・気管支で構成される下気道にはリンパ濾胞は通常時には存在せずM細胞の存在も不明である。BALB/c系統マウス下気道の組織切片を作製し、GP2とTnfaip2抗体による免疫組織染色によってM細胞の分布を調べた。その結果、正常時のマウスにおいてリンパ球浸潤が観察され、近傍の上皮にM細胞が存在することを確認した。呼吸器疾患においては下気道に後天的に形成されるリンパ濾胞が認められる。本研究はRANKLが気管・気管支上皮へのM細胞の誘導を促進することを示している。これは下気道におけるリンパ性器官の誘導・形成機構の解明へとつながるものである。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

RANKL induces microfold cells in tracheobronchial epithelium of the mouse

○Mutoh M¹, Kimura S², Yoshizawa S¹, Iwanaga T², Iida J¹

¹Dept Orthodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

²Lab Histo Cyto, Hokkaido Univ Grad Sch Med

Microfold cell (M cell) resides in the follicle-associated epithelium (FAE) of mucosa-associated lymphoid tissue. M cell is a specialized epithelial cell that delivers luminal antigens to lymphocytes underneath the FAE. Studies on intestinal Peyer's patch M cells during the last decade make it increasingly clear its roles in the intestinal immune response and molecular aspects of M cell differentiation process from intestinal stem cells; on the other hand, little is known about M cells in respiratory tract. In this study, we show that administration of receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) induces M cells in tracheobronchial epithelium of C57BL/6 and BALB/c mouse strains. The RANKL-induced M cells are recognized by antibodies against glycoprotein 2 (GP2) and Tnfaip2, which are proteins expressed in intestinal M cells, and have an uptake capacity of luminal latex beads administered by the nasal route. We further found GP2 Tnfaip2 positive M cells in the tracheobronchial epithelium which closely associated with lymphoid infiltrate in BALB/c mice without exogenous RANKL administration. Our finding suggests that tracheobronchial epithelium contains progenitors capable of differentiation toward M cells triggered by RANKL signaling pathway.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-8 ラットエブネル腺の筋上皮細胞の分布と形態

○平良芙蓉子^{1,2}, 川邊 好弘^{1,3}, 坂東 康彦¹, 崎山 浩司¹, 天野 修¹

¹明海大 歯 解剖

²明海大 歯 口外2

³明海大 歯 オーラルリハビリ

【目的】筋上皮細胞は外分泌腺の腺房に存在し、収縮して腺房細胞を圧迫して分泌の一助を担っていると考えられている。純漿液腺であるラット耳下腺や腭臓外分泌部の腺房には筋上皮細胞は存在しない。従って、筋上皮細胞の有無や形態は、分泌物の粘性と関連があると考えられるが、純漿液性の小唾液腺であるエブネル腺には筋上皮細胞が存在するとの報告がある。本研究では、ラットエブネル腺の筋上皮細胞の分布および形態について免疫組織化学的に検索し、その機能的意義を考察した。【材料・方法】4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定した10週齢雄ラット舌の有郭乳頭部から凍結切片を作製し、抗 α 平滑筋アクチン(SMA)抗体を用いて免疫染色を行い、光学顕微鏡の観察とレーザー顕微鏡による三次元的形態解析を行った。【結果・考察】ラットエブネル腺の腺房と導管にSMA免疫陽性の筋上皮細胞が局在した。腺房の筋上皮細胞は顎下腺と類似して、数本の一次突起から数本の最終突起が分岐していた。また多くの腺房は1個の筋上皮細胞が取り囲んでいた。一次突起の本数はエブネル腺と顎下腺で差がなかったが、エブネル腺の方が最終突起の本数は有位に小さく、一次突起の太さは有位に大きかった。介在部と、それに連続する導管には、輪状と縦走する筋上皮細胞が認められた。エブネル腺では腺房部と導管系両者の筋上皮細胞の発達によって、より強く唾液を有郭乳頭に押し流すことにより、味孔を洗浄し、鋭敏にしているのではないかと考えられた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Morphology and distribution of myoepithelial cell of the rat in von Ebner's glands

○Taira F^{1,2}, Kawabe Y^{1,3}, Bando Y¹, Sakiyama K¹, Amano O¹

¹Div Anat, Meikai Univ Sch Dent

²Div Oral Surg 2, Meikai Univ Sch Dent

³Div Oral Rehabil, Meikai Univ Sch Dent

Introduction: Myoepithelium cells (MECs) are found exclusively in acini and intercalated ducts of salivary and other major exocrine glands. In rodent serous salivary glands, parotid acini lack MECs, whereas acini of the gland of von Ebner (EG) possess developed MECs. In the present study, we investigated immunohistochemically detail morphology and distribution of MECs in the rat in EGs. **Materials and Methods:** Ebner's glands were obtained from the tongue of 10 week-old male Wistar rats, and were fixed with 4% paraformaldehyde by intracardial perfusion. They were prepared for frozen sections and immunohistochemistry using an anti- α smooth muscle actin (SMA) antibody and observed by a light and a confocal laser scanning microscopes. **Result and Conclusion:** Numerous SMA-immunoreactive MECs were recognized along the acinus and duct system of rat EGs. Compared to MECs in rat submandibular glands, MECs in EGs possessed fewer and thicker cell processes. MECs in EGs were similar to those in sublingual glands secreting mucous saliva. In the duct system of rat EGs, MECs locate both circulatory and longitudinally in intercalated duct and adjacent ducts. These results suggest that MECs in EGs are necessary to produce strong pressure to flush the taste pores by saliva in the circumvallate papillae. **Conflict of Interest:** The authors declare no competing interests.

P1-9 ラット舌下腺におけるアディポネクチンの局在

○三宅 言輝^{1,2}, 平良芙蓉子^{1,2}, 坂東 康彦¹, 崎山 浩司¹, 天野 修¹

¹明海大 歯 解剖

²明海大 歯 口腔外科 2

【目的】アディポネクチンは脂肪細胞から産生分泌される抗動脈硬化・抗糖尿作用をもつタンパク質で、血液中に多量に存在する。唾液にも含まれているが、その産生部位や役割について不明な点が多い。本研究では、ラット唾液腺におけるアディポネクチンとその受容体 (adipoR1, adipoR2) の局在を免疫組織化学的に解析した。【方法】生後8週の雄ラットを4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定した。顎下腺、舌下腺、耳下腺、舌の有郭乳頭部 (エブネル腺) の凍結切片を作成し、抗アディポネクチン抗体とアディポネクチン受容体抗体 (R1, R2) および抗 α 平滑筋アクチン抗体を用いてDAB発色および蛍光標識による二重染色を行った。【結果】舌下腺では、筋上皮細胞にアディポネクチンに対する免疫活性が局在し、隣接する腺房細胞の基底・側面の細胞膜に受容体 (R1, R2) に対する免疫活性が局在した。顎下腺、耳下腺、エブネル腺の筋上皮細胞にはアディポネクチン免疫活性は認められなかった。【考察】舌下腺は粘液性の非常に高い唾液を分泌するのに対し、耳下腺やエブネル腺は純漿液性であり、顎下腺は粘液性の低い混合性唾液を分泌する。筋上皮細胞では、舌下腺のみにアディポネクチンが発現し、その受容体が筋上皮と直接接する腺房細胞の細胞膜に局在したことから、粘液性の舌下腺唾液の分泌に対し、アディポネクチンを介した分泌調節機構が存在することが示唆された。【結論】アディポネクチンは舌下腺で筋上皮細胞によって産生され、隣接する腺房細胞に傍分泌的に作用して粘液性唾液の分泌に関与することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Localization of adiponectin and its receptors in sublingual glands of rats

○Miyake G^{1,2}, Taira F^{1,2}, Bando Y¹, Sakiyama K¹, Amano O¹

¹Div Anat, Meikai Univ Sch Dent

²Div Oral Surg 2, Meikai Univ Sch Dent

Objective: Adiponectin is a hormone produced by adipocytes and has anti atherosclerotic and anti diabetic reactions. Adiponectin is contained in saliva as well as blood, however, its function is unclear in salivary glands. In the present study, we investigated immunohistochemically the localization of adiponectin and its receptors (adipoR1 and adipoR2) in rat salivary glands. **Methods:** Male Wistar rats of 8-week-old were fixed by 4% paraformaldehyde solution. Salivary glands and tongue (circumvallate papilla) were prepared for frozen sections and immunohistochemistry using antibodies for adiponectin, adipoR1, adipoR2 and alpha smooth muscle actin (SMA). **Results:** In sublingual glands, immunoreactivity for adiponectin was specifically localized in myoepithelial cells simultaneously immunopositive for SMA. Immunoreactivity for both AdipoR1 and R2 were localized along the basolateral cell membrane of acinar cells. Apical membrane lacked immunoreactivity for both receptors. No adiponectin-immunoreactive myoepithelial cells were found in parotid, submandibular and Ebner's glands. **Discussion and Conclusion:** Sublingual glands secrete the most mucous saliva among major salivary glands. Our results suggest that adiponectin in myoepithelial cells regulates the secretion of mucous saliva by a paracrine fashion.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-10 マウス咬筋の成長発育における CGRP の発現について

○我妻 由梨, 三輪 容子, 佐藤 巖

日歯大 生命歯 解剖 1

神経ペプチドの一種であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) はその血管拡張能により血液供給に影響を及ぼし、炎症や疼痛のメディエーターでもある。骨格筋の成長発育においては筋芽細胞に作用し、神経筋接合部上のアセチルコリンレセプターの制御にも関与する。しかしマウス咬筋における CGRP の発現や局在性に関する報告は極めて少ない。そこで本研究は、胎生 12.5 日, 14.5 日, 17.5 日, 18.5 日齢, 出生後 0 日, 1 日, 5 日齢のマウスを用いて、咬筋の成長発育における CGRP, 血管内皮増殖因子 (VEGF), 血管マーカー (CD31), リンパ管マーカー (LYVE-1), ミオシン重鎖 (MyHCs; embryonic, IIa, IIb, and IIx) の発現量をリアルタイム RT-PCR 法により mRNA レベルにて解析した。加えて組織切片上での CGRP の発現と局在性の分析のために胎生 12.5 日, 14.5 日, 17.5 日齢, 出生後 1 日齢において *in situ* hybridization 法による mRNA の発現解析を行った。その結果, リアルタイム RT-PCR 法では CGRP, CD31, embryonic MyHC 遺伝子の発現レベルは胎生 17.5 日齢にて有意に高かった。主成分分析 (PCA 法) により CGRP と embryonic MyHC, CD31, LYVE-1 の相関性が示され, CGRP と embryonic MyHC に正の相関が認められた。*in situ* hybridization 法では胎生 12.5 日, 14.5 日, 17.5 日齢の咬筋に CGRP 反応が認められ, 生後 1 日齢には認められなかった。これらの結果から CGRP は咬筋の成長発育において主に embryonic MyHC へ影響を及ぼし, 胎生期の脈管新生因子へも作用することが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Expression of CGRP during development of mouse masseter muscle

○Azuma Y, Miwa Y, Sato I

Dept Anat, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a mediator of inflammation and pains of heads that effect to vascular blood supply. CGRP also regulate to a myoblast and acetylcholine receptors on neuromuscular junctions. However, there is unknown about appearance and location at mouse masseter muscle (MM) development. We detected the mRNA abundance of CGRP, vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), CD31, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) and myosin heavy chains (MyHCs; embryonic, IIa, IIb, and IIx) by real-time RT-PCR at embryonic day 12.5 (E12.5), E14.5, E17.5, E18.5, postnatal day 0 (P0), P1 and P5. We also tried to analyze the expression and localization of CGRP by *in situ* hybridization in MM at E12.5, E14.5, E17.5 and P1. The CGRP, CD31, embryonic MyHC abundance levels were high at E17.5. Principal component analysis indicate to specific relation between CGRP and embryonic MyHC, CD31, and LYVE-1 in MM development. The positive correlation between CGRP and embryonic MyHC was analyzed. The antisense probe for CGRP was detected at E12.5, E14.5 and E17.5 and then no detected P1. These data suggested that CGRP may have an influence on embryonic MyHC during mouse MM development. CGRP also affects the angiogenesis markers at embryonic stages.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-11 ヒト全唾液における Basic Proline Rich Lacrimal Protein (BPLP) の動態解析

○瀬賀 拓哉¹, 今井あかね², 加藤 哲男³, 斎藤 英一¹

¹新潟工大 院工

²日歯大新潟短大 歯科衛生

³東歯大 化学

【目的】オピオルフィン(QRFSR)は抗うつ作用や鎮痛作用を発揮する生理活性ペプチドであり、Basic Proline Rich Lacrimal Protein (BPLP) のアミノ末端5残基に相当する。BPLP 遺伝子 (PROL1) の転写産物はRNAの段階でPROL1-001 (前駆体248残基・シグナルペプチド21残基)やPROL1-201 (200・21)などの複数のmRNAに再編集される。それゆえ、オピオルフィンの親タンパク質はバイオマーカーの候補として有望である。本研究では、ヒト全唾液におけるBPLPの動態を解析したので報告する。【材料と方法】新潟工科大学研究倫理委員会の承認を得て、健常者から氷冷試験管中に全唾液を採取した。直ちに、遠心分離(4℃, 12,000 rpm, 20 min)により上清画分を集め、強塩基性陽イオン交換樹脂で分画した。次いで、0.5, 0.75, 1.0M NaCl 溶出画分を逆相クロマトグラフィー(CAPCELL PAK C18)で分離した。各精製画分にトリプシン消化を施し、発生したトリプシン消化断片をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法で解析した。さらに、PROL1抗体(Abnova社製)を用いて各個人の唾液のECL-ウェスタンブロット解析も実施した。【結果と考察】精製タンパク質のトリプシン断片を解析したところ、WVPPSPPPPYDSRLNSPLSLPFVPGR (PROL1-001/-201; 44-69残基), MKLTFFLGLLALISCFT-PSESQR (PROL1-001/-201; 1-23), KLTFFLGLLALISCFTPSESQRFSR (PROL1-001/-201; 2-26), ACHLHISSNPR (PROL1-201; 187-197)が同定された。この結果はBPLPが唾液腺で発現された後、全唾液中で多様なプロテオリシスを受けることならびにBPLPの一部が全唾液中のエクソソームIIに由来する可能性を示唆する。なお、市販のPROL1抗体でBPLPを鮮明に検出することはできなかった。本研究の一部はJSPS科研費(No.15K11063)に支援された。【会員外共同研究者】新潟大 院自然 谷口正之 教授
【利益相反】利益相反状態にはありません。

Characterization of dynamic features of basic proline rich lacrimal protein (BPLP) in human whole saliva

○Sega T¹, Imai A², Kato T³, Saitoh E¹

¹Grad Sch Technol, Niigata Inst of Technol

²Dept Dent Hygiene, Nippon Dent Univ Coll at Niigata

³Dept Chem, Tokyo Dent Coll

The amino terminal QRSFR sequence of basic proline rich lacrimal protein (BPLP) is opiorphin displaying antidepressant and antinociceptive activities. Therefore its parent protein could be a promising biomarker in human body fluids. To utilize this candidate as a biomarker, we have characterized dynamic features of BPLP that is encoded by the PROL1 gene using proteomic approaches. Human whole saliva was collected from volunteers with the approval of the Research Ethics Committee. The supernatant fraction of whole saliva was collected by centrifugation (12,000 rpm, 4 °C, and 20 min). Then, salivary basic components were purified by 2D-liquid chromatography. The purified components were digested with trypsin, and the resulting tryptic peptides were analyzed by MALDI-TOF-MS. Salivary BPLP was examined by western blot with anti-PROL1 antibody (Abnova). The employed antibody was not able to detect salivary BPLP. The tryptic peptide WVPPSPPPPYDSRLNSPLSLPFVPGR (PROL1-001/-201; 44-69 a. a.), MKLTFFLGLLALISCFTPSESQR (PROL1-001/-201; 1-23), KLTFFLGLLALISCFTPSESQRFSR (PROL1-001/-201; 2-26), and ACHLHISSNPR (PROL1-201; 187-197) were found. These results suggest two possibilities: (1) BPLP in whole saliva is subjected to proteolysis. (2) Precursor protein of BPLP from exosome II may be present in this preparation. Supported by JSPS grant (# 15K11063) in part. Non-member co-worker: Prof. Taniguchi M. (Graduate School, Niigata University)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-12 マウス口腔扁平上皮癌細胞株 (Sq1979) の液性因子による間葉系細胞 (10T1/2) を介した免疫抑制作用の促進

○伊藤 宏衣¹, 神谷 真子^{2,3}, 鷺見 成紀^{1,2}, 川木 晴美², 高山 英次², 梅村 直己², 稲垣 慶則^{2,4}, 村松 泰徳¹, 住友伸一郎¹, 近藤 信夫²

¹朝日大 歯 口外

²朝日大 歯 口腔生化

³朝日大 経営 化学

⁴朝日大 歯 麻酔

【目的】 癌による免疫系制御には間葉系間質細胞が重要な役割を果す。C3H マウス口腔扁平上皮癌細胞株 Sq1979 は同系マウス由来の線維芽細胞 (10T1/2) と共に、抗 CD3 抗体刺激脾細胞と共培養するとその IFN- γ 産生能を有意に抑制したが、Sq1979 移植マウスのリンパ節転移巣より樹立したサブクローン (L-5) は抑制作用を示さなかった (稲垣他, 第 57 回 歯科基礎医学会)。Sq1979 細胞特異的な 10T1/2 細胞を介した Th1 型免疫反応の制御機構を解明するために、Sq1979 で活性化している遺伝子群を同定し 10T1/2 細胞との共培養系における発現変化を観察すると共に、その機能解析を試みた。【方法】 L-5 細胞に比べ Sq1979 細胞 (理研 BRC) で発現の高い遺伝子群を cDNA マイクロアレイ法 (SuperPrint G3 Mouse GE Microarray Kit, Agilent) と定量的 PCR 法 (SYBR Premix EX Taq, TaKaRa) により同定し、Transwell を用いた Sq1979 および 10T1/2 細胞との共培養系で発現変化を観察した。さらに中和抗体等を用いて機能的に重要な液性因子の同定を試みた。【結果と考察】 Sq1979 では L-5 細胞群に比べ Saa3, Lcn2, Fxyd2, Il-1 α , Il1f6, Il-6, Ccl7 および Ccl2 mRNA 発現が上昇していた。このうち Ccl2, Ccl7 および Il-6 mRNA レベルは、Sq1979 細胞との共培養により 10T1/2 細胞でも発現が変化した。現在、Sq1979 細胞の産生する Il-1 α , Il1f6 および Il-6 が、10T1/2 の遺伝子発現や、免疫制御にどのような影響を及ぼしているのか中和抗体を用いて検討している。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Enhancement of immunosuppressive effects of mesenchymal cells (10T1/2) by humoral transmission of mouse oral squamous cell carcinoma cells (Sq1979)

○Ito H¹, Kamiya M^{2,3}, Sumi S^{1,2}, Kawaki H², Takayama E², Umemura N², Inagaki Y^{2,4}, Muramatsu Y¹, Sumitomo S¹, Kondoh N²

¹Dept Oral Maxillofac Surg, Asahi Univ Sch Dent

²Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent

³Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

⁴Dept Anesthesiol, Asahi Univ Sch Dent

Mesenchymal stroma cells contribute for tumor-promoting immune suppression. C3H mouse mesenchymal cells, 10T1/2, suppressed IFN- γ -producing capability of mouse spleen cells stimulated by anti CD3+ antibody. This suppressive effect of 10T1/2 cells was enhanced in the co-culture with oral squamous cell carcinoma, Sq1979 cells (RIKEN BRC); however, was not enhanced in that of L-5 cells, established from lymphnode metastases of Sq1979. We screened specifically elevated mRNAs in parental Sq1979 cells, using microarray analysis (SuperPrint G3 Mouse GE Microarray Kit, Agilent) and real time PCR methods (SYBR Premix EX Taq, TaKaRa). We also observed the expression in the co-cultures of 10T1/2 with Sq1979 cells using Transwell (Corning). Our results demonstrated that the expression of Saa3, Lcn2, Fxyd2, Il-1 α , Il1f6, Il-6, Ccl7 and Ccl2 mRNAs was higher in Sq1979 than in L-5 cells. Interestingly, the expression of Ccl2, Ccl7 and Il-6 mRNAs in 10T1/2 cells was significantly changed in the co-culture with Sq1979 cells. These results suggest that soluble factor (s) from Sq1979 modulates 10T1/2 cells. The mechanism of humoral regulation, that may be mediated by Il-1 α , Il1f6 or Il-6 from Sq1979 cells, are under the estimation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-13 ヒト扁平上皮癌細胞 HSC-4 において TGF- β 1 と BMP-2 は相反的に作用する

○千葉 高大¹, 客本 斉子², 石崎 明², 加茂 政晴²

¹岩医大 歯 口外

²岩医大 歯 生化

【目的】癌細胞の転移において、上皮間葉転換 (EMT) は、重要な役割を示すことが知られている。TGF- β スーパーファミリーに属している BMP は、転移先での細胞増殖に重要な間葉上皮転換 (MET) に関与が示唆されているが、ヒト扁平上皮癌細胞 (hOSCC) では、その機作についてはほとんど理解されていない。そこで我々は、hOSCC において単独、および TGF- β 1 存在下での BMP-2 に対する応答を調べた。

【材料・方法】hOSCC 細胞として、HSC-2, HSC-3, HSC-4 及び SAS 細胞株を用いた。BMP-2 (10 ng/ml) と TGF- β 1 (10 ng/ml) の応答に関与する遺伝子とタンパク質は qRT-PCR 及びウェスタンブロット法により解析した。

【結果と考察】4 種類の hOSCC において BMP-2 に応答する細胞の検索を行った結果、HSC-4 細胞で有意な応答が見出されたため、以下では HSC-4 細胞を用いた。BMP-2 の EMT への関与を調べた結果、逆に間葉マーカーである N-cadherin の発現を抑制し、上皮マーカーである CK9 を発現増大させた。また TGF- β 1 処理により細胞増殖の抑制や細胞遊走能の増大を示すのに対して、BMP 処理では細胞増殖能を増大し、遊走能は変化しなかった。以上の結果より、HSC-4 細胞において BMP-2 は、TGF- β 1 と異なり EMT を誘導せずむしろ抑制することが示唆された。そこで両サイトカインを同時あるいは逐次的に作用させ、その応答性を調べた。BMP-2 と TGF- β 1 の同時刺激では、それぞれの量比により間葉マーカー遺伝子の発現が変動し、両者は相反する挙動を示した。加えて、TGF- β 1 処理により EMT を誘導後、BMP-2 を作用させると、一部の間葉マーカー遺伝子の発現の抑制が認められた。従って、HSC-4 細胞において TGF- β 1 と BMP-2 は相反的に作用することが示された。この原因の一つとして、TGF- β 1 処理による BMP のアンタゴニストの発現増大が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

BMP-2 reciprocally regulates TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transition in human oral squamous cell carcinoma cell HSC-4

○Chiba T¹, Kyakumoto S², Ishisaki A², Kamo M²

¹Div Oral Maxillofac Reg, Iwate Med Univ Sch Dent

²Dept Biochem, Iwate Med Univ Sch Dent

Purpose: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is known to exhibit important functions in metastasis. It has been suggested that BMP belonging to TGF- β superfamily is involved in mesenchymal-epithelial transition after metastasis, but the mechanisms have not yet been clarified in human oral squamous cell carcinoma (hOSCC) cells. We examined the responses for BMP-2 and the effects under the coexistence of BMP-2 and TGF- β 1.

Results: HSC-4 cells were most responsive to BMP-2 among 4 hOSCC cell lines. The expression level of mesenchymal marker, N-cadherin was downregulated, whereas epithelial marker, cytokeratin 9 was upregulated in BMP-2-stimulated HSC-4 cells. The cell proliferation was increased in BMP-2-stimulated HSC-4 cells, and the cell migration was unchanged. These results suggest that BMP-2 suppress EMT in HSC-4 cells. We investigated responses of HSC-4 cells to both cytokines treated at the same time or sequentially. The expressions of target genes in HSC-4 cells co-stimulated by BMP-2 and TGF- β 1 were fluctuated according to the ratio of cytokines. Interestingly the expression level of type I collagen-1 α gene was downregulated by BMP-2 stimulation in HSC-4 cells that EMT is induced by TGF- β 1. In addition, the antagonists for BMP were increased by TGF- β 1 stimulation, possibly resulting in the reciprocal regulation between BMP-2 and TGF- β 1.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-14 真空紫外光 (VUV) 照射後に各種条件下で保存した親水化チタン基板の特性解析

○新谷 耕平^{1,2}, 川木 晴美², 石樽 大嗣^{1,2}, 巽 勇介^{1,2}, 梅村 直己², 神谷 真子³,
高山 英次², 堀田 正人¹, 土井 豊⁴, 近藤 信夫²

¹朝日大 歯 保存

²朝日大 歯 口腔生化

³朝日大 経営 化学

⁴朝日大 歯

【目的】チタン製インプラントに対して様々な表面改質が行われている。中でも、紫外光を照射すると表面汚染物質が除去され、親水性が復元し、早期に骨結合すると言われている。我々は真空紫外光 (VUV, $\lambda=172$ nm) をチタン基板に照射し、各種保存液中に保存した後のチタン基板の親水性の変化とチタン基板上での細胞動態について解析してきた。その結果、リン酸緩衝液 (PBS) 中で保存したチタン基板の親水性が照射直後と同等に保たれ、細胞培養系評価でもヒト骨髄由来幹細胞 (hBMSC) の接着と増殖、骨芽細胞分化で他の条件よりも優れていることを報告してきた。本研究では PBS 中での保存効果が長期に維持されるか確かめるため各種保存液に 12 か月間保存し、より長期間保存したチタン基板での親水性変化と細胞活性を検討した。【材料および方法】チタン基板に大気中で VUV を照射し、種々の保存条件で親水性を測定した。そして、基板上へのリン酸基導入について X 線光電子分光法 (XPS) 解析を行った。さらに、VUV 照射後保存したチタン基板上での細胞培養評価を行った。【結果と考察】VUV 照射後 PBS 中に保存したチタン基板の親水性は 12 か月間保存後も照射直後と同等の値を示した。XPS での表面分析の結果、VUV 照射の有無によらず PBS に保存した基盤でリン酸系分子に由来する P2p のピークが認められたが、VUV 照射を行ったチタン基板で、より顕著であった。細胞培養系での評価では、PBS 中に保存したチタン基板で接着、増殖、骨芽細胞様細胞への分化が促進された。以上より、VUV 照射後チタン基板の PBS 中での保存効果は 12 か月間持続し、照射直後と同等の親水性と細胞親和性が保たれることが示され、その効果はチタン基板表面へのリン酸基導入によるものと考えられ、チタン製インプラントの骨伝導性経時劣化を防ぐ保存法として PBS 中に保存することの有用性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Evaluation of properties of the hydrophilic titanium disks stored under various conditions after VUV irradiated

○Shintani K^{1,2}, Kawaki H², Ishigure H^{1,2}, Tatsumi Y^{1,2}, Umemura N², Kamiya M³,
Takayama E², Hotta M¹, Doi Y⁴, Kondoh N²

¹Dept Endodont, Asahi Univ Sch Dent

²Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent

³Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

⁴Asahi Univ Sch Dent

Purpose: Various surface modification methods of the titanium for dental implants have been developed. In this study, we evaluated the characteristics of the titanium disks which were VUV-irradiated and stored in phosphate buffered saline (PBS). **Materials & Methods:** The titanium disks were VUV-irradiated and stored under various conditions as in air, distilled water, saline, and PBS for 12 months, respectively. In order to evaluate the optimal conditions to maintain the photo-induced superhydrophilicity, the hydrophilic property of disks were examined. Surface properties of the disks were analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). We also evaluated the cellular responses to the disks in each storage condition. **Results & Conclusion:** The contact angle of a water droplet on the disks, as an adverse index of superhydrophilicity, decreased steeply after VUV-irradiation. The titanium discs stored in PBS kept the highest hydrophilicity even after 12 months. The P2p peak assigned to phosphoric acid-based molecules was observed in PBS stored disks. In addition, the disks stored in PBS had good effects on cell adhesion, proliferation, and osteoblastic differentiation, as those on the freshly VUV irradiated discs. These findings indicated that storing in PBS would be favorable for the titanium products.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-15 麻酔薬が癌組織微小環境における免疫制御におよぼす影響

○稲垣 慶則^{1,2}, 神谷 真子^{2,3}, 梅村 直己², 川木 晴美², 高山 英次², 鷺見 成紀^{2,4},
伊藤 宏衣^{2,4}, 櫻井 学¹, 智原 栄一¹, 近藤 信夫²

¹朝日大 歯 麻酔

²朝日大 歯 口腔生化

³朝日大 経営 化学

⁴朝日大 歯 口外

【目的】我々は、癌組織微小環境における免疫制御の試験管内 (*in vitro*) モデルとして、マウス口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) と同系マウス由来の線維芽細胞 (10T1/2) および単離脾細胞を用いた共培養系の構築を試みてきた (稲垣ら 第57回歯科基礎医学会学術大会)。本研究では、癌組織微小環境において麻酔薬が免疫応答に与える影響を検討した。【方法】OSCCとしてC3Hマウス類粘膜由来扁平上皮癌細胞株 (Sq-1979細胞, RIKEN BRC) とこの細胞株を移植されたマウスの頸部転移リンパ節から樹立したサブクローン (L6-8細胞) を用いた。また、癌関連間質細胞のモデルとしてC3Hマウス胎児由来線維芽細胞株 (10T1/2細胞, RIKEN BRC) を用いた。脾細胞は同系統マウスより単離し、抗CD3抗体を用いて脾細胞中のT細胞を特異的に48時間刺激した。麻酔薬の細胞障害性はPrestoBlue生細胞試薬を用いて測定した。さらに、麻酔薬が免疫系に及ぼす影響を評価するため、上記細胞の*in vitro*共培養系に麻酔薬を添加し、サイトカイン産生量をELISA法にて測定した。【結果と考察】リドカインの50%細胞毒性濃度 (CC50) は10T1/2 (0.46 mg/ml)、単離脾細胞 (0.55 mg/ml)、Sq-1979-1 (0.60 mg/ml)、L6-8 (0.79 mg/ml) の順に高くなっており、ロピバカインのCC50濃度も同様の傾向を示した。両麻酔薬とも1.25 mg/ml以上の濃度で10T1/2と脾細胞の生存率を0~10%まで著しく低下させたが、OSCC細胞株は20~60%の生存率を維持していた。一方、刺激脾細胞のインターフェロン γ 産生能は、0.24 mg/mlのリドカイン、0.06 mg/mlのロピバカインにより、それぞれ50%にまで抑制された。以上の結果から、10T1/2や脾細胞はOSCC細胞株に比較して局所麻酔薬に対する感受性が高いこと、また、脾細胞の免疫応答能は、細胞毒性を示さないより低濃度でも有意に抑制されることが示された。さらに共培養により再構成した微小環境における免疫制御についても検討する。【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of the anesthetics on the immune response in the microenvironment of tumor tissue

○Inagaki Y^{1,2}, Kamiya M^{2,3}, Umemura N², Kawaki H², Takayama E², Sumi S^{2,4}, Ito H^{2,4},
Sakurai S¹, Chihara E¹, Kondoh N²

¹Dept Anesthesiol, Asahi Univ Sch Dent

²Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent

³Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

⁴Dept Oral Maxillofac Surg, Asahi Univ Sch Dent

We have established an *in vitro* model for tumor microenvironment mimicking tumor-specific immunity, using co-culture system. In this study, we examined the effect of the anesthetics as a modulator affecting the tumor microenvironment, and evaluated the effects on the cytotoxicity and immune response against anti-CD3-antibody-stimulated spleen cells in this co-culture system. A mouse OSCC cell line (Sq-1979 from RIKEN BRC), its sub-clone (L6-8) and an embryonic fibroblastic cell line (10T1/2 from RIKEN BRC) were used. Fifty percent cytotoxicity concentration values (CC50) of lidocaine against 10T1/2 cells, spleen cells, Sq-1979-1 cells and L6-8 cells were 0.46 mg/ml, 0.55 mg/ml, 0.60 mg/ml and 0.79 mg/ml, respectively. The ropivacaine also showed quite similar trend. Viabilities of 10T1/2 and spleen cells were depleted to 0-10%, while OSCC cell lines still maintained a 20-60% viability in both anesthetics at a concentration of more than 1.25 mg/ml. In addition, interferon-gamma producing capabilities of antigen-stimulated spleen cells were reduced to 50% by 0.24 mg/ml lidocaine and 0.06 mg/ml ropivacaine, respectively. These results suggest that 10T1/2 cells and spleen cells have high sensitivity to local anesthetics, compared to OSCC cell lines, and that immune response of spleen cells was more sensitively affected by these drugs.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-16 オートクレーブ滅菌象牙質顆粒 / 幹細胞ハイブリッド骨補填材の機能評価

○奥野公巳郎^{1,2}, 川木 晴美², 田中 雅士¹, 瀧谷 佳晃¹, 河野 哲¹, 梅村 直己²,
高山 英次², 神谷 真子^{2,3}, 吉田 隆一¹, 近藤 信夫²

¹朝日大 歯 歯内療法

²朝日大 歯 口腔生化

³朝日大 経営 化学

歯科領域において、骨再生療法を適用する症例が増加している。このような場合、自家骨移植の代替材料としてハイドロキシアパタイト（以下 HA）、 β -リン酸三カルシウム（以下 β -TCP）等のリン酸カルシウム系骨補填材が臨床応用されており、骨伝導能を示す材料として報告されているが、生体吸収性や親和性における問題点も同時に指摘されている。我々は、象牙質が骨に類似した生体硬組織であり、自家移植へ供給可能な生体材料としての可能性に着目した。そこで、抜歯後凍結保存された歯を骨補填材として利用することを想定し、操作性への考慮から、象牙質を顆粒状に加工した後にオートクレーブ滅菌を行って応用する方法を考案した。今回は既存の骨補填材を比較対照として滅菌象牙質と幹細胞からなるハイブリッド材料をヌードマウス皮下への埋植し6週間後の組織応答の解析と、滅菌象牙質顆粒に残存する生理活性物質についての検討を行った。その結果、ヌードマウス皮下への埋植後6週間の組織では骨補填材のみを埋植した群に比べ、ハイブリッド材料を埋植した群で、コラーゲンに富む組織が形成されており、特に象牙質顆粒とのハイブリッド材料埋植群でのみ一層の骨様組織の形成がみられた。また、タンパク質試料の解析では、未滅菌象牙質試料の電気泳動パターンと比較して滅菌象牙質試料では低分子化がみられるものの、一部で未滅菌象牙質試料より得た泳動パターンと類似する泳動像が観察された。以上より、滅菌象牙質顆粒 / ハイブリッド材料埋植群が骨様組織誘導能を有し、象牙質顆粒にはオートクレーブ滅菌後も硬組織形成を誘導する成分が残されている可能性が示され、自家移植が可能な骨補填材料として象牙質 / 幹細胞ハイブリッド骨補填材の有用性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Evaluation of autoclave sterilized dentin particles / stem cell hybrid materials as a bone substitute

○Okuno K^{1,2}, Kawaki H², Tanaka M¹, Takitani Y¹, Kawano S¹, Umemura N², Takayama E²,
Kamiya M^{2,3}, Yoshida T¹, Kondoh N²

¹Dept Endodont, Asahi Univ Sch Dent

²Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent

³Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

As biochemical components of calcified hard tissues, dentin and bone represent similar constituents. We focused on autogenous dentin, as a biomaterial; we have designed dentin particles and human bone marrow derived stem cells (hBMSCs) complex as a bone substitute. In this study, we evaluated the effects of autoclave sterilized dentin particles / hBMSC hybrid materials as a bone substitute. First, sterilized dentin particle carriers were cultured with hBMSCs for a week, and then, the dentin particles / hBMSC hybrids were transplanted subcutaneously into immunocompromised mice. The hybrid materials induced bone-like tissue. In these hybrids transplanted tissues, fibrous collagens, one of major bone ECM components were observed. Second, we performed SDS-PAGE analysis to detect the residual proteins or peptides in dentin particles after the autoclave sterilization. We found a similar gel electrophoresis pattern among the protein extracts derived from autoclaved and fresh dentin particles. These findings suggested that dentin / stem cell hybrid materials could be applied to an autologous bone substitute.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-17 Kruppel-like factor 5 遺伝子発現の必要最小領域と Sp3 の関与

○美原 希美

日歯大 生命歯 生化

Kruppel-like factor 5 (KLF5) は上皮細胞の増殖・分化バランスをコントロールし、その発現が口腔癌の進行と密接に関連する。KLF5 遺伝子の転写機構を解明することが口腔癌患者の予後改善に繋がると期待されるが、そのほとんどは不明である。本研究では、KLF5 発現に不可欠な遺伝子プロモーターの必要最小領域 (minimal essential region, MER) とそれを制御する転写因子について解析した。様々な長さのプロモーター領域をもつコンストラクトを作製しレポーターアッセイを行ったところ、転写開始点近傍に存在し 6 つの GC box (GC1-GC6) をコードする 186 bp 長の領域 (+145~+330) が MER であり、GC box のミュータントを用いたアッセイの結果から GC1 が最も重要なエレメントであることが明らかになった。GC box 結合転写因子である Sp1, Sp3, Sp4 と MER との結合をクロマチン免疫沈降法で検討したところ、Sp3 が MER と GC1 に対する主要転写因子であることが示された。これらの結果は、Sp-GC box の結合に対するインヒビターと Sp siRNA により確認された。また、Sp3 は KLF5 を発現する口腔上皮組織基底細胞に強く発現していた。以上より、転写開始点近傍の 186 bp が MER であり、GC1 と Sp3 の結合が口腔癌細胞における KLF5 発現の基本因子である可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Minimal essential region required Kruppel-like factor 5 expression and the regulation by Sp3

○Mihara N

Dept Biochem, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Kruppel-like factor 5 (KLF5) transcriptionally regulates gene expression involved in proliferation-differentiation balance of epithelial cells, and its aberrant expression associates with progression of oral carcinomas. Although it suggests a contribution of understanding a mechanism of KLF5 gene transcription to improve the patients' prognoses, the mechanism is uncertain. In this study, we examined the minimal essential region (MER) required for a basal expression of KLF5 and the regulatory transcription factors. Reporter assays using plasmids with various lengths of KLF5 promoter region showed that a 186 bp region (+145-+330) near the transcription start site and clustering six GC boxes (GC1-GC6) was the MER and that GC1 was a most essential element to express KLF5. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays about Sp1, Sp3 and Sp4 that can bind to GC boxes exemplified a predominant binding of Sp3 to GC1. Sp3 protein was immunolocalized at basal cells of oral epithelium that also express KLF5. These data were supported by chemical inhibition of Sp-GC box binding and siRNAs against Sp genes. These results demonstrate that the 186 bp region is the MER and Sp3-GC1 binding is a critical determinant for KLF5 expression.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-18 Surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラーのイオン溶出特性評価

○巽 勇介^{1,2}, 川木 晴美², 石樽 大嗣^{1,2}, 新谷 耕平^{1,2}, 梅村 直己², 神谷 真子³,
高山 英次², 堀田 正人¹, 近藤 信夫²

¹朝日大 歯 保存

²朝日大 歯 口腔生化

³朝日大 経営 化学

【目的】 Surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラーは様々なイオンを溶出する新たなフィラーとして報告されている。このフィラーを応用した歯科材料を開発するためには、S-PRG フィラーから徐放するイオンの種類や量について検討し、その特性を明らかにして、溶出したイオンに対する歯髄組織や歯周組織の応答を明らかにする必要がある。そこで我々は S-PRG フィラーを添加した新たな歯科材料の開発、あるいは S-PRG フィラーから徐放するイオンを含有する抽出液を歯科材料として応用するための基礎データを集積すべく、S-PRG フィラー/溶媒比の異なる S-PRG フィラー抽出液中に徐放されるイオンの量比の検討を行った。**【材料と方法】** 松風株式会社より提供を受けた S-PRG フィラーを用いて S-PRG フィラー/溶媒 (蒸留水 (DW)) 比を 1/100, 1/1,000 および 1/10,000 として室温で 24 時間攪拌し、S-PRG フィラー抽出液を作製した。溶出したイオンの組成を検討するため、ICP 発光分析およびフッ素イオン電極法による測定を行った。**【結果と考察】** S-PRG フィラー/溶媒 (蒸留水 (DW)) 比の異なる抽出液では、溶出するフッ素やストロンチウムイオンの量比も異なり、溶媒比に応じた変化をみせた。フッ素イオンが歯質の酸抵抗性を高めることや、ストロンチウムイオンが硬組織の石灰化を促進することが報告されている。S-PRG フィラー/溶媒比を調節することで溶出するイオンの量比をコントロールし、歯科保健の用途に応じた S-PRG イオン抽出液を作製可能であることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Evaluation of eluted ion properties from the surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) fillers

○Tatsumi Y^{1,2}, Kawaki H², Ishigure H^{1,2}, Shintani K^{1,2}, Umemura N², Kamiya M³,
Takayama E², Hotta M¹, Kondoh N²

¹Dept Oper Dent, Asahi Univ Sch Dent

²Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent

³Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

Purpose: It has been reported that surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) fillers have various ion-releasing abilities. In this study, we evaluate the eluted ion properties from the S-PRG fillers. **Materials & Methods:** S-PRG fillers were obtained by Shofu (Kyoto). The fillers and distilled water (DW) were mixed at a 1/100, 1/1,000, and 1/10,000 ratio by weight. The amount of released ions i.e., strontium ions, from the fillers were analyzed by the inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) and the concentration of fluoride ion was also determined using a fluoride ion electrode method, respectively. **Results & Conclusion:** Various ion release properties were observed among different solute and solvent ratios. The conductive ability of fluoride ions to form the acid-resistant tooth has been well reported in a number of studies. Strontium ion is thought to promote the hard tissue mineralization. Our results showed that we could prepare functional ion solutions to be released from S-PRG fillers advantageous for several purposes intending oral health preservation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-19 癌の増殖における非(低)カルボキシル化オステオカルシンの機能○林 慶和^{1,4}, 川久保-安河内 友世², 倉谷 顕子^{1,3}, 中村 誠司⁴, 平田 雅人¹¹九大 院歯 口腔細胞工学²福岡大 薬 免疫・分子治療³九大 院歯 OBT 研究セ⁴九大 院歯 顎顔面腫瘍制御

オステオカルシン (OC) は骨芽細胞が分泌する骨基質タンパク質であり、3つのグルタミン酸残基がカルボキシル化された Gla 型 OC (GlaOC) と非(低)カルボキシル化状態の Glu 型 OC (GluOC) の2種がある。大部分の OC は GlaOC として骨基質に埋め込まれるが、わずかな量は血液中にも存在する。また、骨代謝の過程で一部は脱カルボキシル化されて、GlaOC, GluOC 共に体内を循環している。OC が個体の骨代謝レベルを反映することから、癌の骨転移では OC が血中高値を示し骨転移マーカーになるという報告もあるが、癌の病態におけるオステオカルシンの役割は未解明な部分が多い。まず、癌の病態における OC の役割について解析したところ、GlaOC は細胞増殖を促進したが GluOC は細胞増殖を抑制した。すなわち、癌の病態において GlaOC と GluOC の作用が相反していた。そこで、GluOC の抗腫瘍効果に着目し、*in vitro* および *in vivo* での解析を行った。

マウスメラノーマ細胞株 (B16) に GluOC を添加し、WST-8 法および BrdU 法にて細胞増殖能を調べたところ、細胞増殖を抑制した。GluOC による増殖抑制のメカニズムを調べるため、受容体型チロシンキナーゼ (RTK: Receptor Tyrosine Kinase) リン酸化アレイを用いて各種 RTK のリン酸化レベルについて解析したところ、GluOC は複数の RTK のリン酸化レベルを抑制した。このことから、GluOC の抗腫瘍効果は複数の RTK のリン酸化レベルの抑制を介していることが示唆された。次に、B16 を皮下移植した C57BL/6 担癌雌マウスに対して、徐放性浸透圧ポンプを用いて GluOC を継続投与したところ、GluOC 投与群ではコントロール群と比べ有意に腫瘍径が小さくなり腫瘍も軽量であった。また、組織学的解析により、投与濃度依存的に腫瘍組織において OC を検出した。このことから投与した GluOC が直接癌の増殖を抑制したことが示唆された。

以上より GluOC が複数の RTK のリン酸化レベルの抑制を介して抗腫瘍効果を表すことが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Functions of uncarboxylated osteocalcin in cancer progression○Hayashi Y^{1,4}, Kawakubo-Yasukochi T², Kuratani A^{1,3}, Nakamura S⁴, Hirata M¹¹Sect Mol Cell Biochem, Kyushu Univ Grad Sch Dent²Dept Immunol Mol Pharmacol, Fukuoka Univ Pharm Sci³OBT Res Cent, Kyushu Univ Grad Sch Dent⁴Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Osteocalcin (OC), an osteoblast-derived peptide hormone, is present in general circulation as both carboxylated (Gla) and uncarboxylated (Glu) forms, and serum OC level is thought to be an index of the properties of bone. Recent studies demonstrated that high circulating OC levels constitute a marker for bone metastasis in prostate cancer patient. However, there is no evidence on a mechanistic basis that OC directly deteriorates pathological status of the cancer.

In this study, we first demonstrated that cancer growth was accelerated by GlaOC, but suppressed by GluOC. The anti-tumor mechanism of GluOC was then investigated, focusing on B16 melanoma cells. As a result, GluOC suppressed tumor growth *in vivo*, as well as *in vitro*, and administrated OC was detected in tumor region. In addition, Phospho-Receptor Tyrosine Kinase Array analysis revealed that GluOC reduced the phosphorylation levels of several receptor tyrosine kinases.

These results indicate that GluOC induces anti-tumor effects by inhibiting receptor tyrosine kinase activities.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-20 JNK シグナリングは骨芽細胞の多様性分化を制御する

○楠山 譲二, 大西 智和, 松口 徹也

鹿大 院医歯 口腔生化

【背景】 オステオポンチン(OPN)は骨分化マーカーの1つで, サイトカイン様の働きで慢性骨代謝性疾患における炎症に関わることが推定されている. 我々は最近, 骨分化誘導時に c-Jun N-terminal Kinase (JNK)活性を抑制すると, 石灰化基質形成が阻害され, オステオカルシン(OCN)の発現が抑制されるが, OPN の発現が著しく上昇した骨芽細胞が出現することを見出した. 本研究は骨芽細胞には石灰化誘導型の一般的分化形式(OCN型)と OPN を多量発現する分化形式(OPN型)が存在し, 分化誘導条件の違いで分化形式の方向が変化する可能性を検討した. 【方法と結果】 C57BL/6 マウス由来骨芽細胞及び骨芽細胞株 MC3T3-E1 をアスコルビン酸, BMP2, FGF2 で JNK 阻害剤存在下に分化誘導すると, 細胞種や分化誘導因子の差異によらず, OCN を発現せず OPN を高発現する細胞が出現した. また OPN 型と OCN 型の分化方向の変化には, 骨分化ごく初期の JNK 活性が重要であることが分かった. JNK 内因性制御分子である JNK 特異的フォスファターゼ DUSP16 欠損マウスでは, OPN 型骨芽細胞の出現率が減少し, 血清中 OPN 量は有意に低かった. 次に未分化骨芽細胞, OCN 型, OPN 型の発現遺伝子を網羅解析し, OPN 型に特徴的な分泌タンパク質群と, 特異的表面発現分子群を見出した. 更に OPN 分泌型への分化制御因子として, inhibitor of differentiation 4 (Id4)を同定した. Id4 を強制発現させると OPN 分泌型の出現比は増加し, Id4-shRNA の導入は JNK 活性阻害によって誘導される OPN 型の出現を抑制した. その分子機構として, 抑制性転写因子 Hey1 が OPN プロモーター部位に結合しており, Id4 は Hey1 と複合体を形成し, Hey1 の機能を阻害することで, OPN 分泌型骨芽細胞への分化を誘導していることが示唆された. 【考察】 骨芽細胞分化には OCN 型と OPN 型のような多様な分化形態が存在し, これは初期の JNK 活性によって制御される Id4 の発現量の増減で調節されている可能性がある.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

JNK signaling regulates multifunctional differentiation of osteoblasts

○Kusuyama J, Ohnishi T, Matsuguchi T

Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Osteopontin (OPN) is osteogenic marker protein which have regulatory effects on inflammatory diseases and bone metabolic disorders. We previously reported that specific inhibition of c-jun N-terminal kinase (JNK) significantly inhibited osteogenic differentiation characterized by matrix mineralization and the gene expression of osteocalcin (OCN). In contrast, JNK inactivation did not inhibit the OPN expression. We hypothesized that there are multifunctional types of osteogenic differentiation, such as OCN secretion type and OPN secretion type. OPN-highly expressing cells were induced to differentiated by ascorbic acid, BMP-2, or FGF-2 with JNK-specific inhibitor in both primary osteoblasts and MC3T3-E1 cells. We found that initial JNK activity was essential for the induction of OPN type osteoblasts. The appearance of OPN type was decreased in DUSP16, a JNK specific phosphatase, knockout mouse. Gene expression analysis using DNA microarray revealed that OPN type osteoblasts specifically express secretory proteins and some surface markers. Moreover, inhibitor of differentiation 4 (Id4) suppressed the inhibitory effect of Hey1 on OPN promoter activity and regulated the induction of OPN type osteoblasts. Our findings suggested that JNK signaling regulates multifunctional differentiation of OPN and OCN type osteoblasts.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-21 口腔扁平上皮癌の原発巣と転移巣における骨髄由来免疫抑制細胞の検討

○鷺見 成紀¹, 梅村 直己², 高山 英次², 伊藤 宏衣¹, 神谷 真子³, 川木 晴美²,
近藤 信夫², 住友伸一郎¹

¹朝日大 歯 口外

²朝日大 歯 口腔生化

³朝日大 経営 化学

【目的】我々は、マウス口腔扁平上皮癌細胞(OSCC)株Sq1979を同系統マウスに移植し宿主免疫系への影響を検討してきた(第55, 56, 57回歯科基礎医学会学術大会)。炎症や担癌状態などの病的状態において、骨髄由来抑制細胞(MDSCs)が造血器官(脾臓内)、末梢血中、腫瘍組織内やリンパ節において増加することが知られている。また、MDSCsは、 $CD11b^+ LY6G^+ LY6C^{low}$ をGranulocytic MDSC(G-MDSC)、 $CD11b^+ LY6G^- LY6C^{hi}$ をMonocytic MDSC(M-MDSC)とした2つの群に分けることができ、Arginase1・活性酸素・IL-10・TGF- β などの産生を通して様々な免疫担当細胞の不活化やTreg(制御性T細胞)の誘導をきたし、T細胞や他の骨髄由来細胞を制御することにより腫瘍免疫を抑制することが知られている。そこで今回、我々は、口腔癌の原発巣とリンパ節転移巣における腫瘍免疫反応の違いをMDSCsの観点から検討した。【方法】C3Hマウス頬粘膜由来扁平上皮癌細胞株Sq1979(理研BRC)とマウスにSq1979を移植しリンパ節転移した組織から樹立したリンパ節転移巣由来癌細胞株L5-11を用いた。両細胞株をマウスの側腹皮下にそれぞれ移植し、移植後20日目の脾臓内MDSCsと腫瘍内MDSCs分画をフローサイトメトリーにて解析した。【結果と考察】リンパ節転移巣由来癌細胞株L5-11移植20日後の脾臓内MDSCsと腫瘍内MDSCsは原発巣モデルと比較して総細胞数に対する割合は変化していなかったが、MDSCs自体の細胞数は有意に増加していた。また、MDSCsのT細胞の抑制機能に必須であるArginase1の増加を認めた。これらのことから、リンパ節転移能の高いL5-11移植マウスにおいては、Sq1979移植マウスに比べMDSCsが活性化することで腫瘍免疫が抑制されていることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

An inquest of myeloid derived suppressor cells in primary tumor and metastasis tumor of oral squamous cell carcinoma

○Sumi S¹, Umemura N², Takayama E², Ito H¹, Kamiya M³, Kawaki H², Kondoh N²,
Sumitomo S¹

¹Dept Oral Maxillofac Surg, Asahi Univ Sch Dent

²Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent

³Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

Purpose: Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) is known that enhanced at lymphoid organ, peripheral blood and tumor microenvironment by tumor bearing situation. Moreover, MDSCs induce various immune cells including Treg (regulatory T cell) by Arginase 1, NO, IL-10, and TGF- β , and is classified into two groups according to a definition. In this study, we investigate the divergence of tumor immunity in primary and metastasis tumors of oral squamous cell carcinoma mice model. **Methods:** We used mice oral squamous carcinoma cell line (Sq1979) that was derived from C3H mice buccal mucosa squamous cell carcinoma, and L5-11 that was established from lymphnode metastases of Sq1979 cells. The intrasplenic and intratumoral MDSCs were examined by flow cytometry analysis. **Results and Conclusion:** The proportion of MDSCs against total spleen cells of the Sq1979-bearing mice showed no difference compared to that of the L5-11-bearing mice. However, the total number of MDSCs significantly increased in L5-11-bearing mice. Moreover, Arginase1 expression of MDSCs, which is required for suppressive function to T cell, increased in the cells from later mice. Our findings suggested that tumor immunity could be more intensively suppressed by the activation of MDSCs in L5-11-bearing mice than in Sq1979-bearing mice.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-22 TPD52 遺伝子の発現は TIA-1 及び TIAR によって mRNA の安定性を介して転写後制御される

○本橋 宏美, 椋代 義樹

昭大 歯 口外

【目的】新規のタンパクファミリーである Tumor Protein D (TPD) ファミリーは癌の浸潤・増殖・転移に重要な働きを示し TPD52 ファミリーの TPD52 の mRNA は他のファミリーに比べ 3'-UTR が長く AU リッチ配列が多く存在するため、mRNA の転写後遺伝子発現制御を検索した。

【方法・材料】SAS 細胞, 正常線維芽細胞, HeLa 細胞を用い核 Run on assay, RT-qPCR 法, RNA degradation assay を行い, TPD52, 53, 54 の総 RNA 量, mRNA の転写活性および半減期の測定を行った。次に GFP キメラ遺伝子を作成し, SAS 細胞にトランスフェクションし GFP の発現を FACS にて測定した。さらに mRNA の全長及び様々な断片の cDNA を作製し, GFP 遺伝子の 3'-末端に繋いで同様のレポーターベクターを作製し, FACS 解析及び RNA degradation assay を行い最小活性単位 (cis-element) の検索を行った。さらに RIP assay と Biotin pull-down assay を用い, この領域に結合する trans 因子の単離を行った。

【結果】TPD52, 53, 54 遺伝子の総 RNA 量と mRNA の転写活性は発現量と同じ傾向を示したが, TPD52 mRNA の半減期は細胞種依存的に異なっていた。FACS 解析で GFP の発現量は特に TPD52 mRNA 3'-UTR により増強された。TPD52 mRNA 3'-UTR のさまざまな deletion mutant のうち 5' 側の 78-280 領域が RNA の安定性に関与する最小活性部位であるとわかった。RIP assay および Biotin pull-down assay により 78-280 領域に TIAR-1/TIAR が特異的に結合し, TIA-1 と TIAR を siRNA で knock-down すると TPD52 mRNA 3'-UTR の遺伝子発現増強作用および mRNA の安定化作用は減弱した。

【考察】TPD52 mRNA は転写後修飾を受け安定性が変化する。TPD52 mRNA の発現量は mRNA の安定性と相関関係があり, その安定性に関与する最小領域の一つは, 3'-UTR の 5' 末端に存在する 78-280 領域である。さらにこの領域に TIA-1/TIAR が結合し RNA の安定性が制御されることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

TPD52 expression is post-transcriptionally regulated by TIA-1 and TIAR via mRNA stability

○Motohashi H, Mukudai Y

Dept Oral Surg, Showa Univ Sch Dent

The tumor protein D52 (TPD52) family includes TPD52, 53, 54 and 55, and plays important role in cancer metabolism except for TPD55. However, most of the gene expression regulatory systems of this family have not been characterized. Analysis of the mRNA of this family has revealed that the 3'-untranslated region (3'-UTR) is longer than the coding region. Recently, we uncovered the role of the 3'-UTR of TPD52 family mRNA in post-transcriptional regulation of gene expression. In addition, we found that mRNA in SAS cells was more stable than in other cancer or normal cells, suggesting the important role of post-transcriptional regulation of mRNA in regulation of the TPD52 gene. In the present study, we analyzed the regulatory mechanism in more detail, and found that TPD52 family gene expression is regulated by both transcriptional and post-transcriptional processes. Moreover, the results of a chimeric reporter gene assay revealed that the minimal cis-acting element of the 3'-UTR of TPD52 mRNA is located in the area between proximal positions 78 and 280. Of note, we also found that some RNA-binding proteins, including TIA-1 and TIAR, have important roles in regulating gene expression at the post-transcriptional level, such as roles in mRNA stabilization.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-23 細胞外マトリックスタンパクフィブリン7とそのC末端フラグメントタンパクによる新しい血管関連疾患治療の可能性—フィブリン7の *in vivo* における血管新生抑制活性—

○池内 友子¹, Forcinito Patricia¹, de Vega Susana², Amaral Juan³, Rodriguez Ignacio³,
平澤 (有川) 恵理², 山田 吉彦¹

¹米国立衛生研 歯科・頭蓋顔面研

²順天堂大 院医 老人性疾患病態治療研究セ

³米国立衛生研 眼研

悪性腫瘍, 加齢黄斑変性症などの疾患は血管新生による病態の重症化が知られている. その治療標的として血管新生の抑制が注目されるが, 正常血管を維持したまま病的な血管新生を選択的に抑制することは難しく, 急激な血管新生抑制活性による正常血管の機能障害が副作用として更なる病態の悪化を招くこともある. 我々は無血管組織である軟骨, 角膜などに発現する細胞外マトリックスに血管新生抑制活性があると仮説をたて, フィブリン7 (Fbln7) がそれらの組織に共通して発現していることを見い出した. Fbln7 は我々の研究室がマウス白歯の cDNA ライブラリーから同定した Fbln ファミリー分子のひとつであり, 我々は Fbln7 の C 末端フラグメントタンパク (Fbln7-C) が *in vitro* でヒト臍帯静脈内皮細胞のチューブ形成抑制活性があることを明らかにした. 本研究では *in vivo* における Fbln7 の血管新生抑制活性の検討を目的とし, ラットの眼を使った血管新生評価モデルを用いて解析した. 血管新生を誘導する7-ケトコレステロールとフルレングス Fbln7 (Fbln7-FL) または Fbln7-C を混合したインプラントを作製し, 手術でラットの角膜下に挿入した後, 7, 10 日後に蛍光色素を血管へ投与しインプラントへの血管新生領域を検証した. その結果, コントロール群に比べ Fbln7-FL と Fbln7-C を混合したインプラントでは血管新生領域は大きく減少していた. Fbln7-C による血管新生抑制メカニズムを解析したところ, Fbln7-C は血管内皮細胞増殖因子受容体 2 (VEGFR2) と結合し, VEGFR2 の下流シグナルを阻害することが示唆された. 病的な新生血管では VEGFR2 の発現が増強することが報告されており, Fbln7-FL と Fbln7-C には病的な新生血管を選択的に抑制する血管関連疾患治療の新しい可能性が期待される.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Anti-angiogenic activity of the extracellular matrix protein fibulin-7 and its C-terminal fragment *in vivo*

○Ikeuchi T¹, Forcinito P¹, de Vega S², Amaral J³, Rodriguez I³, Hirasawa E², Yamada Y¹

¹Mol Biol Sec, Lab Cell and Dev Biol, NIDCR, NIH

²Res Inst for Disease of Old Age, Juntendo Univ Grad Sch Med

³Lab of Retinal Cell and Mol Biol NEI, NIH, Bethesda, MD, USA

Many angiogenesis-related diseases, such as cancer and age-related macular degenerative disease (AMD) cause considerable morbidity and mortality. There is a need to find a highly efficient anti-angiogenic therapeutic with few side effects. Fibulin-7 (Fbln7) is a newly discovered member of the fibulin extracellular matrix (ECM) protein family that serves as a cell adhesion molecule and interacts with ECM molecules, receptors, and growth factors. Fbln7 is also expressed in the cartilage and blood vessels. Using a recombinant protein approach, we previously showed that the C-terminal Fbln7 fragment (Fbln7-C) inhibits tube formation by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in cultures. In this study, we examined the anti-angiogenic activity of full-length Fbln7 (Fbln7-FL) and Fbln7-C *in vivo*, using a rat corneal model. We prepared three types of biodegradable implants. Each of the implants contained a combination of the pro-angiogenic lipid 7-ketocholesterol (7KCh) and Fbln7-FL or Fbln7-C. Relative to the control, both Fbln7-FL and Fbln7-C implants inhibited neovascularization. We are also studying the mechanism of the anti-angiogenic activity of Fbln7-C. We have found that Fbln7-C binds to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and inhibits VEGF signaling. Our results suggest that Fbln7-C is a potential therapeutic compound for diseases associated with angiogenesis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-24 炭酸含有アパタイト骨補填材の破骨細胞分化に及ぼす影響

○高橋 潤¹, 川木 晴美², 近藤 雄三¹, 梅村 直己², 神谷 真子³, 高山 英次²,
田辺俊一郎¹, 土井 豊⁴, 永原 國央¹, 近藤 信夫²

¹朝日大 歯 インプラント

²朝日大 歯 口腔生化

³朝日大 経営 化学

⁴朝日大 歯 理工

歯科インプラント治療では骨補填材の需要が増加している。しかし、既存の骨補填材では組織再生後も残存するなどの問題点があり、自家骨移植の代替材となりうる人工骨補填材の開発が急務である。このような背景から、我々は骨アパタイトと同等の炭酸イオンを含む炭酸含有アパタイト(CA)を開発した。そしてCA上で培養したラット骨髄由来未分化間葉系細胞の増殖と、骨芽細胞様細胞への分化を促進すること、その作用には Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 1/2 および p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 経路が関与していることを報告してきた。今回は、CAと、比較対照として水酸化アパタイト(HA)、 β -リン酸三カルシウム(β -TCP)顆粒をヌードマウス皮下に移植し、移植後のCAと周囲組織の応答について検討するとともに、骨補填材存在下で骨髄由来細胞を培養し、破骨細胞分化におよぼす影響について検討した。その結果、マウス皮下組織では、埋植6週間後でCAの顆粒周囲に骨様組織の形成が観察され、TRAP陽性細胞も観察された。破骨細胞への分化を検討するため、骨補填材上で骨髄細胞含有抽出液を活性型ビタミンD存在下で3日間培養したところ、CA上にTRAP陽性細胞が顕著に出現した。また、M-CSF, RANKL存在下ではアクチンリングを呈する多核の巨細胞がCA上で多数観察され、培地中のCa, P濃度が上昇していた。以上よりCAはHAおよび β -TCPと比較して、皮下組織において異所性に硬組織を誘導し、一方で破骨細胞による吸収をも受けやすい骨補填材料であることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effects of carbonate apatite on the osteoclastic differentiation as a bone substitute

○Takahashi J¹, Kawaki H², Kondo Y¹, Umemura N², Kamiya M³, Takayama E², Tanabe T¹,
Doi Y⁴, Nagahara K¹, Kondoh N²

¹Dept Oral Implantol, Asahi Univ Sch Dent

²Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent

³Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

⁴Dept Dent Mater Sci, Asahi Univ Sch Dent

Our previous studies demonstrated that sintered carbonate apatite (CA) was superior to hydroxyapatite (HA) and β -tricalciumphosphate (β -TCP) with regard to promote proliferation and osteoblastic differentiation of rat mesenchymal stromal cells proliferation through the MAPKs, ERK1/2 and p38 pathways, respectively. In this study, we investigated in detail the properties of CA as a bone substitute. First, we evaluated the ectopic osteoconductivity of CA in immunocompromised mice. Second, we evaluate the utility of CA promoting osteoclastic differentiation of the rat bone marrow derived cells in culture. As a result of osteoconductive assessment, bone-like tissue was notably observed around the CA particles in mouse models after 6 weeks of the implantation. Osteoclastic differentiation represented by TRAP positive cells or multinuclear giant cells with actin fiber ring were remarkably observed on CA. Our data suggested that CA is a useful material for bone regeneration.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-25 Neuropeptide Y Y1 受容体の阻害による MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化の誘導

○箭原 元基¹, 田村-辻 潔美², 田村 正人²

¹北大 院歯 口腔顎顔面外科

²北大 院歯 口腔分子生化

Neuropeptide Y (NPY)は、36 アミノ酸残基よりなる生理活性ペプチドで中枢神経系に広く存在し、食欲、エネルギー消費、記憶など広範な生命現象に関与している。NPYは末梢においても交感神経末端でカテコールアミンのコトランスミッターとして働く。NPY欠失マウスでは骨量が増大することや骨芽細胞もNPYを産生することなどから、骨代謝においても重要な役割を果たしている。近年、Gタンパク質共役型受容体の一つであるNPY Y1受容体(Y1R)の骨芽細胞特異的遺伝子欠失マウスにおける骨量の増大が報告された。私達は、すでにC2C12細胞においてBMP2シグナルがY1Rの発現を誘導することを報告した(BBRC, 2013)が、骨芽細胞におけるNPY-Y1Rシステムの詳細については明らかではない。そこで、本研究ではMC3T3-E1細胞においてRNA干渉を用いたY1Rのノックダウンによる影響を調べ、骨芽細胞におけるNPY-Y1Rシステムがautocrineに作用し得るかを明らかにすることを目的とした。Y1R siRNAによってMC3T3-E1細胞のALP活性および石灰化が増加し、ALP、オステオカルシン、Col α (I)およびBSPのmRNA量も増加した。siRNAによるY1R阻害は、osterixやRunx2の発現を増加させたが、細胞増殖やcaspase3/7活性には影響を及ぼさなかった。アスコルビン酸および β グリセロリン酸存在下では、Y1R siRNAはMC3T3-E1細胞のALP活性と石灰化をさらに増大した。これらの結果は、Y1Rの阻害によって骨芽細胞分化を誘導することおよび骨芽細胞においてNPY-Y1Rシステムはautocrineに作用して骨芽細胞の分化を負に制御している可能性が示唆された。【会員外共同研究者】佐藤真理, 鄭漢忠 (北大)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Inhibition of neuropeptide Y Y1 receptor induces osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells

○Yahara M¹, Tsuji-Tamura K², Tamura M²

¹Dept Oral Maxillofac Dent, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

²Dept Oral Biochem Mol Biol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

The neuropeptide Y (NPY) has known as one of the major neural signaling molecule. In addition, the NPY, produced by peripheral tissues including osteoblasts, binds to its Y1 receptor (Y1R) which belongs to the GPCR family. Osteoblasts-specific Y1R knockout mice revealed a high bone mass, indicating a role for the NPY-Y1R axis as a regulator of bone homeostasis. In bone microenvironment, both peripheral nerve fiber and osteoblasts releases NPY. However, the autocrine effects of NPY-Y1R axis on osteoblasts remain unexplored. In the present study, we used an RNA interference approach targeted to Y1R to determine whether NPY-Y1R axis acts as an autocrine for controlling osteoblasts. We found that knockdown of Y1R by siRNA results in induction of ALP activities and mineralization in MC3T3-E1 cells. The mRNA expression level of ALP, osteocalcin, α (I) collagen and BSP was also increased by Y1R siRNA. Although following transfection with Y1R siRNA, Runx2 and osterix mRNA expression was increased, cell proliferation and caspase3/7 activity did not alter in these cells. These results show that Y1R inhibition up-regulates osteoblastic differentiation, suggesting a role for the NPY-Y1R axis as an autocrine mechanism in osteoblasts and of regulator for osteoblastic differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-26 代謝モニタリング・システムを用いた癌細胞の糖・アミノ酸代謝活性測定と代謝活性に対する環境 pH の影響

○森島 浩允^{1,2}, 鷺尾 純平¹, 北村 淳^{1,2}, 高橋 哲², 高橋 信博¹

¹東北大 院歯 口腔生化

²東北大 院歯 顎顔面口外

【目的】癌細胞は解糖系の亢進（warburg 効果）や glutamine 代謝の亢進といった特異的代謝を持ち、癌周囲の pH は変動しやすい。しかし、癌細胞の代謝をモニターする方法は確立されておらず、また、癌細胞代謝に対する環境 pH の影響については不明な点が多い。そこで本研究では、口腔扁平上皮癌細胞を用いて代謝モニタリング・システムを確立し、糖・アミノ酸代謝を測定するとともに代謝活性に対する環境 pH の影響を、正常細胞と比較して検討した。【方法】口腔扁平上皮癌細胞由来の細胞株（HSC-2 及び HSC-3）とヒト表皮角化細胞株（HaCaT）を用いた。通法で培養した細胞を生理食塩水中に一定密度で懸濁し、基質（5 mM glucose, glutamine あるいは glutamate）を加え、各 pH（6.5, 7.0, 7.5 及び 8.0）での代謝活性を pH-stat 法にて測定した。また、アミノ酸を基質とした場合には NH₃ 産生量も測定した。【結果及び考察】代謝に伴い産生された乳酸や二酸化炭素等の酸を pH-stat で継時的に測定することで代謝活性をモニターできた。pH 7.5 における HSC-2, HSC-3, HaCaT の酸産生速度は、それぞれ 25.6 ± 3.2 , 14.0 ± 1.7 , 14.0 ± 1.7 (glucose), 3.6 ± 1.2 , 3.6 ± 0.6 , 5.7 ± 2.1 (glutamine), 6.3 ± 0.6 , 6.3 ± 1.5 , 7.3 ± 1.5 nmol/min (glutamate) であった。また、glutamine 代謝活性は NH₃ 産生量からも推測できることが示された。代謝活性は pH 低下に伴って低下し、pH 8.0 での代謝活性を 100 とした際、pH 6.5 における HSC-2, HSC-3, HaCaT の活性は、それぞれ 40.2 ± 11.6 , 41.5 ± 3.1 , $9.3 \pm 15.1\%$ (glucose), 0, 0, $13.8 \pm 0.1\%$ (glutamine), 0, 0, $6.9 \pm 0.1\%$ (glutamate) となった。癌細胞と正常細胞の間で有意差はみられなかった。環境 pH の低下に伴って、全ての細胞の糖・アミノ酸代謝が同程度に低下したことから、本実験条件においては、癌細胞の環境 pH 変化に対する代謝優位性はみられなかった。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Estimation of the glucose/amino acid metabolism of cancer cells using a metabolism-monitoring system and effects of environmental pH on the metabolism

○Morishima H^{1,2}, Washio J¹, Kitamura J^{1,2}, Takahashi T², Takahashi N¹

¹Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Div Oral Maxillofac Surg, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Objective: The environmental pH around cancer cells fluctuates through their characteristic metabolism, including Warburg effects and glutaminolysis. However, due to the lack of a monitoring system for the metabolic activity of cancer cells at a fixed environmental pH, the effect of pH on their metabolism was still unknown. Therefore, we attempted to establish the monitoring system and elucidate the pH effect. **Method:** Oral squamous cell carcinoma strains (HSC-2, HSC-3) and a normal cell (HaCaT) were used. The cultured cells were suspended in saline, and then mixed with substrates (5 mM glucose, glutamine, or glutamate) at 37°C and pH 6.5, 7.0, 7.5 or 8.0. The acid production was monitored with pH-stat, while the ammonia production was measured with ammonia meter. **Results and Discussion:** In the present study, the metabolic activity was estimated successfully by monitoring the production of acids such as lactic acid and CO₂ with pH-stat. The glutamine metabolic activity could also be estimated by ammonia production. All the cells decreased their metabolic activities as the environmental pH was lowered. There was no significant difference between cancer and normal cells, suggesting that cancer cells possess no superiority of metabolism in the alteration of environmental pH under our experimental conditions.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-27 Surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラー抽出液のヒト歯髓由来幹細胞の動態におよぼす影響

○石樽 大嗣^{1,2}, 川木 晴美², 巽 勇介^{1,2}, 新谷 耕平^{1,2}, 梅村 直己², 神谷 真子³,
高山 英次², 堀田 正人¹, 近藤 信夫²

¹朝日大 歯 保存

²朝日大 歯 口腔生化

³朝日大 経営 化学

【目的】 Surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラーは様々なイオンを溶出する新たなフィラーとして報告されている。このフィラーを応用して新たな歯科材料を開発するためには溶出したイオンに対する歯髓組織や歯周組織の応答を明らかにする必要がある。そこで我々は、溶出イオン量の異なる S-PRG フィラー抽出液からなる培地を作製し、ヒト歯髓由来幹細胞 (hDPSCs) を培養して、溶出イオンに対する hDPSCs の応答について解析した。**【材料と方法】** 松風株式会社より提供を受けた S-PRG フィラーを用いて S-PRG フィラー/溶媒 (細胞培養用培地 (MEM)) 比を 1/100, 1/1,000 および 1/10,000 として室温で 24 時間攪拌して S-PRG フィラー溶出イオン含有培地を作製した。溶出したイオンの組成を検討するために、ICP 発光分析およびフッ素イオン電極法による測定を行った。さらに S-PRG フィラー溶出イオン含有培地を用いて hDPSCs を培養し、増殖の検討およびアルカリホスファターゼ (ALP) 活性染色を行った。**【結果と考察】** S-PRG フィラー/溶媒 (MEM) 比の異なる抽出液では、溶出するフッ素やホウ酸、ストロンチウムイオンの量比も異なり、溶媒比に応じた変化をみせた。ストロンチウムイオン濃度の高い培地では hDPSC の増殖が促進され、ホウ酸イオン濃度が高い培地で hDPSC の ALP 活性が上昇した。以上のことから目的に応じた細胞の賦活化や、増殖、骨芽細胞分化マーカーの 1 つである ALP 活性の上昇などに適した、口腔保健上の様々な用途に応じた S-PRG イオン抽出液を作製可能であることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effects of the surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) filler eluate on the human dentin pulp stem-cell (hDPSC) activities

○Ishigure H^{1,2}, Kawaki H², Tatsumi Y^{1,2}, Shintani K^{1,2}, Umemura N², Kamiya M³,
Takayama E², Hotta M¹, Kondoh N²

¹Dept Endodont, Asahi Univ Sch Dent

²Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent

³Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

It has been reported that S-PRG fillers had a various ion-releasing ability. In this study, we evaluate the properties of cell culture media containing the S-PRG eluate using the hDPSCs in culture. S-PRG fillers were obtained by Shofu. The fillers and cell culture media (MEM) were mixed at a 1/100, 1/1,000, and 1/10,000 ratio by weight. The amount of released ions i.e., strontium ions, from the fillers were analyzed by the inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). The concentration of fluoride ion was also determined using a fluoride ion electrode method. The hDPSCs were maintained for 7-14 days in these media. For the evaluation of cell proliferation, Alamar Blue fluorescent solution was used, and additionally, ALP staining was performed. Different ion release properties were observed in experimental media with each conditions in a solute and solvent ratio as a dependent on a manner. One of media containing higher concentration of strontium ion promoted proliferation of hDPSCs. On the other hand, another MEM with higher concentration of borate ions, increased the ALP activity of hDPSCs. These results showed that we could obtain the functional and cytocompatible S-PRG eluate releasing the various ions for several purposes of oral health cares.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-28 長期使用義歯からの細菌由来揮発性代謝産物の検出

○互野 亮¹, 末永 華子², 鷲尾 純平³, 佐々木啓一¹, 高橋 信博³

¹東北大 院歯 口腔システム補綴

²東北大 院歯 予防歯科

³東北大 院歯 口腔生化

【目的】長期使用義歯には新製義歯に無い臭いがあり、唾液や口腔内細菌の関与が考えられる。義歯臭気に関して、義歯の清掃状況と口臭の関連や就寝時も義歯を使用する患者の口臭増加といった報告はあるものの、義歯そのものの臭いについての報告はない。そこで本研究では、口腔内細菌代謝産物であり口臭の原因物質とされる VSCs (硫化水素・メチルメルカプタン・ジメチルサルファイド)、アンモニア、および有機酸を長期使用義歯から検出・定量し、義歯の臭気の原因について検討することを目的とした。【方法】使用年数2年以上の義歯4床(ポリメチルメタクリレート (PMMA) 製)からレジン片を一定量切り出し試料とした。試料をシリコン栓付試験管に入れ、37°Cのインキュベーター、または100°Cのオーブン中に1時間保った後、試験管内の気相に含まれる VSCs を簡易ガスクロマトグラフにて測定した。また、試料を37°Cあるいは100°Cで脱イオン水あるいはエタノール溶液に浸漬し、抽出されたアンモニアを簡易アンモニアメーターにて、各種有機酸を高速液体クロマトグラフにて測定した。【結果】37°Cでは VSCs は検出されなかったが、100°Cでは全試料から硫化水素が、一部の試料からメチルメルカプタン (19-35 ppb)、ジメチルサルファイド (3-43 ppb) が検出され、その検出量については義歯の個体差がみられた。また、3片からアンモニア (1.88-6.07 nmol) が検出された。有機酸は検出されなかった。【考察】VSCs およびアンモニアが義歯臭気の原因である可能性が示された。工業用 PMMA 表面がアンモニアにより劣化すること、義歯床用レジンの光反射率や光透過特性がメチルメルカプタンにより低下することが報告されていることから、細菌由来代謝産物である VSCs やアンモニアは義歯臭気の原因となるだけでなく、義歯床の劣化の原因にもなる可能性が考えられる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Detection of oral bacteria-derived volatile metabolites from long term used removable denture

○Tagaino T¹, Suenaga H², Washio J³, Sasaki K¹, Takahashi N³

¹Div Adv Prosthet Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Div Prevent Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

³Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Objective: Although long-term used removable denture has specific smell due to saliva or oral bacteria, the detail of denture odor is still unknown. This study aimed to detect and quantify bacteria-derived volatile metabolites, VSCs (hydrogen sulfide, methyl mercaptan, dimethyl sulfide), ammonia and organic acids, in used dentures, to investigate the causes of denture odor. **Materials and Methods:** The samples, cut from 4 long-term used dentures made of polymethyl methacrylate (PMMA), were placed in tube with silicon cap for 1 hour at 37°C or 100°C, and VSCs in the gas phase were measured by gas chromatograph. Furthermore, after samples were immersed in deionized water or ethanol solution at 37°C or 100°C, extracted ammonia and organic acids were measured by ammonia meter and high performance liquid chromatography, respectively. **Results:** The hydrogen sulfide was detected in all samples, while methyl mercaptan and dimethyl sulfide were detected in some samples. Though ammonia was detected in 3 samples, organic acids were not detected. **Discussion:** The results suggest that VSCs and ammonia cause denture odor. Since ammonia and methyl mercaptan are known to induce the deterioration of PMMA surface, bacteria-derived VSCs and ammonia might cause not only denture odor but also denture deterioration.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-29 ブタ幼若および成熟エナメル質中の TGF- β アイソフォームについて

○大久保水羽¹, 小林 冴子², 山本 竜司³, 齊藤 まり³, 長野 孝俊¹, 五味 一博¹,
大井田新一郎³, 山越 康雄³

¹鶴大 歯 歯周

²鶴大 歯 小児歯

³鶴大 歯 分子生化

哺乳類のトランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- β) には3種類のアイソフォーム ($\beta 1$ - $\beta 3$) が存在し, 形成過程のブタエナメル質中には TGF- $\beta 1$ が存在するが, その他については不明である. 【目的】そこでブタ幼若および成熟エナメル質中の TGF- β アイソフォームの分離と同定を試みた. 【方法】生後約5ヶ月のブタ永久第二大臼歯より幼若 (S) 及び成熟 (H) エナメル質を採取し, リン酸緩衝液 (pH7.4) (N) と炭酸緩衝液 (pH10.8) (AL) を用いてタンパク質を抽出した. N 画分はさらに硫酸を用いて分画し, AL 画分はヘパリンクロマトグラフィー (HC) で分離した. 硫酸分画および HC で得られた画分をヒト歯根膜由来培養細胞 (hPDL 細胞) に添加して ALP 活性の測定を TGF- β 活性として評価した (ALP-HPDL). また TGF- $\beta 1, \beta 2, \beta 3$ 抗体を用いた ELISA により画分中の TGF- β アイソフォームを同定した. 【結果】S および H 試料の N 画分から硫酸分画によって3つの画分 (S-N1~S-N3 および H-N1~H-N3) を得た. また S-AL および H-AL 画分は HC により5つの画分 (S-AL1~S-AL5 および H-AL1~H-AL5) に分離された. ALP-HPDL では, S および H 試料共に N1>AL1>AL2 の順で ALP 活性が高く検出され, 活性はすべての画分において S>H で高かった. TGF- $\beta 1$ 抗体を用いた ELISA では ALP-HPDL の結果に依存して陽性であったが, TGF- $\beta 3$ 抗体では ALP-HPDL で検出されなかった H-AL2~H-AL5 で陽性であった. また TGF- $\beta 2$ は検出されなかった. 【考察】基質形成期エナメル質では TGF- $\beta 1$ が, 成熟期エナメル質では TGF- $\beta 1$ と $\beta 3$ が共存することが示唆された. さらに TGF- $\beta 3$ は HPDL 細胞に対して ALP 活性を上昇させないことが考えられた.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

TGF- β isoforms in porcine immature and mature enamel

○Okubo M¹, Kobayashi S², Yamamoto R³, Saito M³, Nagano T¹, Gomi K¹, Oida S³,
Yamakoshi Y³

¹Dept Periodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Our **objective:** is to identify TGF- β isoforms in porcine immature (S) and mature (H) enamel of developing teeth. **Methods:** Proteins were sequentially extracted with phosphate (pH 7.4) (N) and carbonate (pH 10.8) (AL) buffers. The N extracts was further fractionated by successive ammonium sulfate fractionation (AS), while the AL extracts was isolated by heparin affinity chromatography (HC). The TGF- β activity in each of fractions was evaluated by determining ALP-inducing activity in hPDL cells. The TGF- β isoforms were identified by ELISA against TGF- $\beta 1, \beta 2$ and $\beta 3$ antibodies. **Results:** The N extracts were fractionated into three fractions (S-N1~S-N3 and H-N1~H-N3) by AS, while the AL extracts were separated into five fractions (S-AL1~S-AL5 and H-AL1~H-AL5) by HC. The N1, AL1 and AL2 fractions in both S and H enamel enhanced ALP-inducing activity in order of N1>AL1>AL2 and the ALP activity in S enamel was higher than it in H enamel. ELISA with TGF- $\beta 1$ antibody was positive depending on the result of ALP activity, but that with TGF- $\beta 3$ antibody was positive against H-AL2~H-AL5 fractions. No positive signal was detected against TGF- $\beta 2$ antibody. **Discussion:** These results suggest that TGF- $\beta 1$ is predominant in the secretory-stage enamel, while both TGF- $\beta 1$ and $\beta 3$ coexist in the maturation-stage enamel.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-30 ブタ幼若エナメル質中の TGF- β 1 とエナメルタンパク質との相互作用について

○小林 冴子¹, 山本 竜司², 大井田新一郎², 朝田 芳信¹, 山越 康雄²

¹鶴大 歯 小児歯

²鶴大 歯 生化

ブタ幼若エナメル質中には TGF- β 1 が含まれているが, その動態については明らかにされていない。【目的】我々はエナメル質形成過程における TGF- β 1 の遺伝子発現, 活性化および不活化, エナメルタンパク質との相互作用について調べた。【方法】生後約 5 ヶ月のブタ永久切歯エナメル器より基質形成期, 移行期, 成熟期に相当する領域から total RNA を調製して潜在型 TGF- β 1 (Latent TGF- β 1) の遺伝子発現を定量 PCR にて分析した。次に MMP-20 および KLK4 による TGF- β 1 の活性化および不活化についてヒト歯根膜由来培養細胞に対するアルカリホスファターゼ活性を測定することで評価した。さらに同齢のブタ永久大白歯の幼若エナメル質よりアメロゲニンの分離・精製を行い, TGF- β 1 に対する *in vivo* 相互作用は ELISA の応用とマルチアングル動的光散乱法(DLS)にて, *in vitro* 相互作用はリコンビナント TGF- β 1 に対する結合実験にて調べた。【結果】Latent TGF- β 1 はエナメル質形成過程における全ステージで遺伝子発現が認められ, 特に移行期で高い発現を示した。TGF- β 1 は MMP-20 で活性化され, KLK4 では失活傾向にあった。 *In vivo* 相互作用では基質形成期の主要アメロゲニンに TGF- β 1 が結合しているタイプが存在することが判明した。 *In vitro* 結合実験においても上記精製アメロゲニンにはさらに TGF- β 1 と結合できる能力を有していることが判明した。それらアメロゲニンのうち水溶性アメロゲニンを用いた DLS 実験ではアメロゲニン三量体と TGF- β 1 がモル比 1:1 で結合していることが判明した。【考察】エナメル質形成過程において, TGF- β 1 は MMP-20 によって活性化され, 主要アメロゲニンと結合して存在し, 成熟期には KLK4 によって失活することが示唆された。【利益相反】利益相反状態にはありません。

Interaction of TGF- β 1 and enamel proteins in porcine enamel

○Kobayashi S¹, Yamamoto R², Oida S², Asada Y¹, Yamakoshi Y²

¹Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Porcine enamel extracts contain a TGF- β 1, although the molecular interactions responsible for its activity remain undefined. Our **objective:** was to elucidate how enamel proteins and proteases affect the status of TGF- β 1 during enamel formation. **Methods:** Enamel organ epithelia corresponding to the secretory, transition and maturation stages were prepared from tooth germs of permanent incisors and the gene expression of latent TGF- β 1 was analyzed by quantitative PCR. The activation and inactivation of TGF- β 1 by MMP-20 or KLK4 was evaluated by determining ALP-inducing activity in hPDL cells. The major amelogenins purified from the developing molar were used for the interaction experiments against TGF- β 1 *in vivo* or *in vitro*. **Results:** The latent TGF- β 1 was expressed in three stages of ameloblasts. MMP-20 activated TGF- β 1, while KLK4 lost its activity. Both *in vivo* and *in vitro* studies revealed that there are amelogenins unbound or bound to TGF- β 1 in porcine immature enamel and that the amelogenin-TGF- β 1 complex possesses the further binding ability. Moreover, DLS analysis indicated that the binding state of the amelogenin-TGF- β 1 complex corresponds to the amelogenin trimer and active TGF- β 1 homo dimer with a molar ratio of 1:1. **Conclusion:** In porcine immature enamel, major amelogenins and enamel proteases affect the status of TGF- β 1.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-31 Er:YAG レーザーによるブタ歯髄組織への影響について

○山川駿次郎¹, 丹羽 堯彦², 小林 一行³, 山本 竜司⁴, 細矢 哲康^{1,4}, 山越 康雄⁴

¹鶴大 歯 歯内療法

²鶴大 歯 歯周病

³鶴大短大 歯科衛生科

⁴鶴大 歯 分子生化

Er:YAG レーザー (レーザー) は歯科治療において様々な用途で使われており, 歯内治療においては露髄面にレーザー照射をすることで歯髄組織に賦活作用をもたらすが, その作用機序についてはまだ不明な点が多い. 【目的】我々はレーザー照射によって惹起される歯髄組織中のタンパク質および生理活性物質について調べることを目的とした. 【方法】生後約5ヶ月のブタ第二大臼歯より採取した歯髄にレーザーを照射 (50mJ, 10PPS, 30秒, 距離2cm) し, 3日間インキュベーション後, NP40細胞溶解液を用いてタンパク質を抽出した. レーザー未照射試料をコントロールとして同様にタンパク質を抽出した. レーザー照射群および未照射群のタンパク質試料をヒト歯根膜由来培養細胞 (hPDL細胞) に添加し, ALP活性の測定を行ってレーザー照射有無に対する歯髄組織中のTGF-β活性の影響を評価した. また抽出タンパク質の変化およびプロテアーゼ活性をSDS電気泳動 (SDS-PAGE) およびザイモグラフィーにて比較した. さらに未照射群の抽出物試料をヘパリン・クロマトグラフィーにて分離し, 各画分の凍結乾燥試料に対してレーザー照射を行い, 惹起されたプロテアーゼの同定を質量分析にて試みた. 【結果】レーザー照射は歯髄組織に含まれる内在性のTGF-βを活性化させる効果を示した. SDS-PAGEでは55kDaのタンパク質バンドの増加が見られ, ゲラチンザイモグラフィーでは61, 53, 45, 40kDaのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性が顕著に増加し, カゼインザイモグラフィーでは33kDaのnon-MMPが活性化された. ヘパリン・クロマトグラフィーにおいては, この33kDaプロテアーゼはヘパリンとの結合親和性を示した. 【結論】歯髄組織に対するレーザー照射はTGF-βおよびプロテアーゼの活性化をもたらすことが判明した.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Effect of Er:YAG laser irradiation for porcine pulp tissues

○Yamakawa S¹, Niwa T², Kobayashi K³, Yamamoto R⁴, Hosoya N^{1,4}, Yamakoshi Y⁴

¹Dept Endodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dent Periodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Dent Hyg, Tsurumi Jr Coll

⁴Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Er:YAG laser (laser) provides the activator action in pulp tissues. Our objective is to investigate the protein and physiologically active substance in pulp raised by the laser irradiation. **Methods:** Pulp tissues prepared from the second molar of 5-months-old pigs with or without the laser irradiation (50mJ, 10pps, 30 sec) were incubated for 3 days and proteins were extracted with NP-40 cell lysis buffer. The action of TGF-β in protein sample was evaluated by the determination of ALP activity in hPDL cells. Moreover, the protein sample extracted from pulp tissues without the laser irradiation was fractionated by a heparin affinity chromatography and characterized by SDS-PAGE and zymography. **Results:** The ALP activity in pulp tissues was increased by laser irradiation. Following the laser irradiation, the intensity of protein band at 55 kDa was increased on SDS-PAGE. On zymography, the gelatinolytic matrix metalloproteases (MMP) having the molecular weight (MW) of 61, 53, 45 and 40 kDa and the caseinolytic non-MMP having MW of 33 kDa were dramatically increased. Also the 33 kDa non-MMP possessed the heparin-binding affinity. **Conclusion:** The laser irradiation for pulp tissue involves in the activation of TGF-β and some of proteases.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-32 生理的乳歯歯根吸収組織の存在する TGF- β 1 の発現と破歯細胞の分化誘導調節について

○島崎 絵美¹, 唐木田丈夫², 山本 竜司², 朝田 芳信¹, 山越 康雄²

¹鶴大 歯 小児歯

²鶴大 歯 分子生化

生理的乳歯歯根吸収は様々な生理活性物質によって分化誘導された破歯細胞が関与するが、その作用機序については未だ不明な点が多い。【目的】我々は乳歯歯根周囲組織に存在する TGF- β が及ぼす破歯細胞の分化誘導調節の解明を試みた。【材料と方法】1. 生後約 5 ヶ月のブタ下顎骨から歯根吸収乳切歯 (R) および非歯根吸収乳切歯 (N) を抜去し、歯頸部 (1)、歯根部 (2)、歯根先端部 (3) の領域に切断した歯牙試料 (R1, R2, R3 および N1, N2, N3) の周囲軟組織中のタンパク質を Triton X (X) 溶液・NP40 細胞溶解液・SDS 溶液を用いて連続的に抽出し、SDS-電気泳動 (SDS-PAGE) によって各画分の抽出タンパク質の比較を行った。2. 各画分中の TGF-B 活性を HPDL 細胞に対する ALP 活性の上昇で、3. また破歯細胞の産生評価を TRAP 活性の上昇で調べた。4. 次に定量的 PCR を行って TGF-B 遺伝子と各種破歯細胞分化促進および抑制因子遺伝子の発現量を調べた。5. さらに歯牙領域の非脱灰切片を作製し、破歯細胞の観察を行った。【結果と考察】1. SDS-PAGE 像では各抽出画分において R3 試料のタンパク質の著しい減少が観察された。2. TGF-B 活性は N 試料の X 画分において、3. また TRAP 活性は X 画分の R2 試料において顕著な上昇が観察された。4. 組織観察では R2 から R3 の領域で破歯細胞様細胞の存在を確認した。5. 遺伝子解析では、TGF-B と OPG 遺伝子が N 試料優位に、破歯細胞マーカーである RANK, NFATc1, TRAP 遺伝子は R 試料優位に発現が見られた。以上の結果から、破歯細胞分化誘導に対する TGF-B の作用は OPG によって制御されることが示唆され、OPG の発現がほぼ見られなくなる領域では成熟破歯細胞への分化誘導が起こり、歯根吸収が行われることが考えられた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Action of TGF- β in root-surrounding tissues of deciduous teeth

○Shimazaki E¹, Karakida T², Yamamoto R², Asada Y¹, Yamakoshi Y²

¹Dept Pediatr, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Odontoclast is involved in the physiological root resorption of deciduous teeth. Our **objective**: is to investigate that TGF- β in root-surrounding tissues on deciduous teeth regulates the differentiation induction into odontoclast. **Methods**: Root-surrounding tissues of porcine deciduous teeth with (R) or without (N) the root resorption were surgically scraped at three regions (R1-R3 or N1-N3) from tooth cervical area to apical area. Each of tissue samples was used for (1) protein characterization, (2) determination of TGF- β activity, (3) evaluation of odontoclastic differentiation potency and (4) qPCR analysis for expression of TGF- β and marker genes of odontoclast. The localization of TRAP in odontoclast at three regions was observed by TRAP staining. **Results**: Amount of proteins was significantly low in R3 sample. TGF- β or TRAP activities were high in R1 or R2 samples, respectively. The qPCR analysis revealed that the expression of TGF- β 1 and osteoprotegerin (OPG) was significantly high in N1 and N2 samples, while the expression of marker genes for odontoclast was high in R2 and R3 samples. The localization of TRAP in odontoclast was observed at R2 and R3 regions. **Conclusion**: The differentiation induction into odontoclast mainly occurs at tooth cervical area and the action of TGF- β is regulated by OPG.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-33 Ameloblastin and enamelin regulate osteoclastogenesis by modifying RANKL expression via p38 and Erk1/2 MAPKs signalling pathways

○Chaweewannakorn Wichida^{1,2}, 牧 憲司², 有吉 渉¹, 沖永 敏則¹, 西原 達次¹

¹九齒大 感染分子生物

²九齒大 口腔機能発達

Ameloblastin and enamelin regulate osteoclastogenesis by modifying RANKL expression via p38 and Erk1/2 MAPKs signalling pathways

○Chaweewannakorn W^{1,2}, Maki K², Ariyoshi W¹, Okinaga T¹, Nishihara T¹

¹Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ

²Div Pediatr Dent, Kyushu Dent Univ

Purpose: Ameloblastin (Ambn) and enamelin (Enam), members of enamel-related gene products (ERPs), have been known to play an important role in tooth morphogenesis especially in enamel biomineralization. Recent studies show that ERPs also affect bone metabolism. However, the specific pathways by which ERPs function have not been clearly identified during bone remodelling. In the present study, we examined the effects of Ambn and Enam on receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) expression induced by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (1, 25(OH)₂D₃) and dexamethasone (DEX) on ST2 cells and attempted to propose the underlying mechanisms that involved in the process.

Materials and Methods: ST2, a bone marrow derived-stromal cell line were cultured with minimum essential medium eagle- α modification (α -MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and stimulated with 1, 25(OH)₂D₃ and DEX for the indicated time. RT-qPCR and western blot analysis were subjected to examine the expression of RANKL, OPG and ERPs. To determine the effects of Ambn and Enam on RANKL expression and the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), we pretreated ST2 cells with recombinant human Enam (rhEnam) or recombinant human Ambn (rhAmbn) and then induced with 1, 25(OH)₂D₃ and DEX. In some experiments, ST2 cells were pretreated with MAPKs inhibitors (U0126, SB203580 and JNKinhibitorII) prior to stimulate with 1, 25(OH)₂D₃ and DEX and then the effects of MAPKs on RANKL expression was determined by RT-qPCR and western blot analysis.

Results: Firstly, we found that ERPs, RANKL and osteoprotegerin (OPG) expressed on ST2 cells in a time-dependent manner. Consequently, pretreatment of ST2 cells with rhEnam or rhAmbn down-regulated RANKL mRNA and protein expression induced by 1, 25(OH)₂D₃ and DEX. Interestingly, rhAmbn and rhEnam suppressed the phosphorylation of MAPKs such as ERK1/2, JNK and p38 in ST2 cells stimulated with 1, 25(OH)₂D₃ and DEX. These effects were time-dependent, with maximal reduction at 30 minute. Furthermore, pretreatment with specific inhibitors of p38 and ERK1/2, but not JNK blocked RANKL mRNA and protein expression.

Conclusion: Taken together, these results indicated that Ambn and Enam may indirectly regulate RANKL induced-osteoclastogenesis via down-regulation of p38 and ERK1/2 MAPKs signalling pathways.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-34 インターロイキン-1 β で刺激した軟骨細胞による NADPH-オキシダーゼに依存した細胞外マトリクスの分解

○船登 咲映^{1,2}, 安原 理佳³, 宮本 洋一¹, 吉村健太郎¹, 美島 健二³, 馬場 一美², 上條竜太郎¹

¹昭大 歯 口腔生化

²昭大 歯 補綴

³昭大 歯 口腔病態診断 口腔病理

変形性関節症(OA)は関節軟骨における軟骨細胞の細胞死と細胞外マトリクス成分の減少を特徴とし、その制御は患者のQOL向上に極めて重要な意義を持つ。OAの発症にはインターロイキン-1 β (IL-1 β)等の炎症性サイトカインや活性酸素種(ROS)の関与が指摘されている。我々は、IL-1 β で刺激された軟骨細胞におけるROS産生酵素NADPHオキシダーゼ(NOX)2の発現誘導がIL-1 β 刺激後の軟骨細胞の細胞死に必須であることを報告した[J Biol Chem 286:14744-52, 2011]。そこで今回、IL-1 β 刺激後の軟骨細胞培養系での細胞外マトリクスの減少におけるNOX2の役割を解析した。マウス軟骨細胞様ATDC5細胞をIL-1 β で刺激すると、軟骨の主要な細胞外マトリクスタンパク質であるII型コラーゲンとアグリカンのmRNA発現が低下したが、RNA干渉によるNOX2の発現抑制はこれらの遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。したがって、これらの細胞外マトリクスタンパク質の発現低下にNOX2は関与しないと考えられた。一方、NOX阻害剤あるいはROS消去剤は、IL-1 β が引き起こす細胞外プロテオグリカンおよびヒアルロン酸の減少を抑制した。このことはIL-1 β によって発現誘導されるNOX2由来のROSが、IL-1 β 刺激後の細胞外マトリクスの分解に関与することを示唆する。さらに、軟骨細胞のヒアルロニダーゼ活性もNOXの阻害により抑制された。IL-1 β 刺激により細胞内外が酸性化した。NOX2のアンチセンスRNAはこの酸性化とプロテオグリカン減少を抑制した。以上より、IL-1 β で刺激した軟骨細胞では、NOX2活性に依存した酸性化が起こり、酸性に至適pHを持つヒアルロニダーゼが活性化されることでヒアルロン酸分解を促進し、アグリカン等の細胞外マトリクスタンパク質の遊離をもたらすと考えられた。OAの関節液は正常に比べ酸性であることが知られている。今回の発見は、OAにおける軟骨変性を全く新しい観点から説明するもので、OAの新規治療法の開発に直結するものと期待できる。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Degradation of extracellular matrix by chondrocytes after exposure to interleukin-1 β in an NADPH oxidase-dependent manner

○Funato S^{1,2}, Yasuhara R³, Miyamoto Y¹, Yoshimura K¹, Mishima K³, Baba K², Kamijo R¹

¹Dept Biochem, Showa Univ Sch Dent

²Dept Prosthodont, Showa Univ Sch Dent

³Dept Oral Diagnostic Sci, Div Pathol, Showa Univ Sch Dent

Chondrocyte death and matrix loss are major changes in the articular cartilage of osteoarthritic patients. We reported that expression of NADPH oxidase (NOX) 2, a reactive oxygen species (ROS)-producing enzyme, induced by interleukin-1 β (IL-1 β) was required for death of chondrocytes exposed to IL-1 β . Here we investigated roles of NOX2 in production and degradation of extracellular matrix by chondrocytes. While IL-1 β suppressed the expression of mRNAs for type II collagen and aggrecan, the major components of extracellular matrix of cartilage, NOX2 siRNA did not affect it, indicating NOX2 was not involved in the suppressed expression of these genes. On the other hand, an NOX inhibitor or a ROS scavenger suppressed the IL-1 β -induced reduction in proteoglycan and hyaluronan, indicating that ROS produced by NOX2 was required for matrix degradation. Inhibition of NOX also lowered hyaluronidase activity of the culture. Antisense RNA for NOX2 suppressed extra- and intracellular acidification as well as proteoglycan loss induced by IL-1 β . Since the optimal pH of hyaluronidases is in the acidic region, it was suggested that NOX2-dependent acidification increased the activity of hyaluronidases, which resulted in loss of hyaluronan and extracellular matrix components. Our findings will provide progress in both basic and clinical studies on osteoarthritis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-35 W9 ペプチドのヒト破骨細胞分化抑制作用と骨芽細胞分化促進作用

○中村美どり^{1,2}, 小出 雅則², 山下 照仁², 小林 泰浩², 高橋 直之², 宇田川信之^{1,2}

¹松歯大 口腔生化

²松歯大 総歯研

【目的】分化誘導ペプチド W9(WP9QY)は, RANKL と結合することにより, 破骨細胞の分化を阻害し, 卵巣摘出モデルにおける骨量減少を防止する. 今回, ヒト末梢血単球培養系における破骨細胞および樹状細胞の分化とヒト骨髓間質細胞を用いた骨芽細胞分化に対する W9 ペプチドの効果を検討した.

【対象と方法】健康人ボランティアから採取した末梢血由来の単球を RANKL と M-CSF の存在下で 14 日間培養するヒト破骨細胞培養系に W9 を添加し, TRAP 染色を行った. 同様に採取したヒト単球を GM-CSF と IL-4 の存在下で 10 日間培養するヒト樹状細胞培養系に W9 を添加し, ヘマトキシリン染色を行った. ヒト骨髓間質細胞に W9 ペプチドを添加して 12 日間培養後, アルカリホスファターゼ(ALP)染色および mRNA 発現の解析を行った.

【結果】ヒト破骨細胞培養系で形成される TRAP 陽性の多核細胞は W9 ペプチドの添加 (50~200 μ M) により濃度依存的に阻害された. ヒト樹状細胞培養系で形成される多核を呈する樹状細胞の形成は W9 ペプチドの添加による影響は認められなかった. ヒト骨髓間質細胞培養系に W9 ペプチドを添加するとアルカリホスファターゼ(ALP)陽性の骨芽細胞の分化誘導促進作用が濃度依存性に認められた.

【考察】RANKL に結合する W9 ペプチドは, RANK シグナルを阻害することにより破骨細胞分化を抑制する. さらに, W9 ペプチドは骨芽細胞表面の RANKL に結合し骨芽細胞分化を誘導するものと考えられる. RANKL-RANK シグナルは, 骨吸収のみならず, 骨芽細胞による骨形成にも重要な役割を有する可能性が示された.

会員外共同研究者: 古屋優里子 保田尚孝 (オリエンタル酵母工業株式会社) 中道裕子 (松本歯科大学)

【利益相反】利益相反状態にはありません.

A RANKL-binding peptide W9 inhibits human osteoclast differentiation and stimulates human osteoblast differentiation

○Nakamura M^{1,2}, Koide M², Yamashita T², Kobayashi Y², Takahashi N², Udagawa N^{1,2}

¹Dept Oral Biochem, Matsumoto Dent Univ

²Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ

A RANKL-binding peptide WP9QY (W9) is known to inhibit mouse osteoclastogenesis. In addition, W9 showed an anabolic effect on cortical bone in mice *in vivo*. W9 bound RANKL and differentiated osteoblasts with production of autocrine factors like BMP. In this experiment, we examined the effects of W9 on differentiation of osteoblasts, osteoclasts and dendritic cells in human culture system. Osteoclasts and dendritic cells are derived from common progenitors, such as bone marrow-derived macrophages. W9 strongly inhibited multinucleated osteoclast formation in human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures in the presence of RANKL and M-CSF for 14 days as well as strikingly stimulated alkaline phosphatase (ALP)-positive osteoblast differentiation in human bone marrow stromal cells for 12 days. In contrast, W9 have no effect on dendritic cell differentiation in PBMC cultures in the presence of GM-CSF and IL-4 for 10 days. These experimental results indicate that W9 inhibited human osteoclast formation but not dendritic cell differentiation and directly stimulated osteoblast differentiation via RANKL signaling-mediated autocrine factors. Our findings suggest that the reverse signal from RANK on osteoclasts to RANKL on osteoblasts, and the forward signal from RANKL to RANK, could play an important role in the coupling between bone-formation and bone resorption.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-36 生理活性物質を有する脱灰骨シートを用いたインプラント周囲の骨増生

○白井 麻衣¹, 山本 竜司², 小松浩一郎³, 下田 信治⁴, 山越 康雄², 大井田新一郎²

¹鶴大 歯 有床義歯補綴

²鶴大 歯 生化

³鶴大 歯 薬理

⁴鶴大 歯 解剖 1

【目的】 臨床において抜歯後の歯槽骨吸収は避けられず、インプラント治療を行う際の障害となる。骨増生における遮蔽膜の有効性は既に知られているが、生理活性物質を含むメンブレンは少ない。そこで本研究は、シート状に成形した生理活性物質を有する脱灰骨シートを用いたときの即時インプラント周囲歯槽骨の骨増生について検討した。**【材料と方法】** SD ラットの大腿骨を塩酸処理し、脱灰骨シートを製作、シートの形態学的・生化学的分析を行った。1) ラットの上顎左側第一大臼歯の抜歯のみ、2) 近心根抜歯窩に実験用インプラントを埋入したもの、3) インプラントを埋入した後、近心根以外の抜歯窩を脱灰骨シートで被覆したもの、4) 脱灰骨パウダーをシート下の抜歯窩に充填したもの、5) タンパク質を抽出した後の脱灰骨シート（抽出後シート）で被覆したものの5群に分類した（n=5）。4週後に屠殺、micro-CT撮影を行い、抜歯窩相当部の骨形態の分析を行った。同時に組織学的分析を行い、骨-インプラント接触率・インプラント周囲骨基質面積の評価を行った。**【結果】** 脱灰骨から抽出したタンパク質から生理活性物質が検出された。生理活性物質を有する脱灰骨シートを用いた条件は有意に歯槽骨高径を挙上し、組織学的分析よりシートが骨に置換する傾向を認めた。抽出後シートの骨置換は認められなかった。**【結論】** 生理活性物質を含む吸収性メンブレンの抜歯即時の使用は抜歯窩の治癒および骨増生に有効であることが示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Bone augmentation around a dental implant using demineralized bone sheet containing biologically active substances

○Shirai M¹, Yamamoto R², Komatsu K³, Shimoda S⁴, Yamakoshi Y², Oida S²

¹Dept Removable Prosthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Pharmacol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

⁴Dept Oral Anat, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Objectives: This study was designed to evaluate the volume of alveolar bone augmentation after immediate implant placement with demineralized bone. We examined the collagen matrix of demineralized bone and biologically active substances contained therein. **Methods:** Rat femurs were demineralized, and it was trimmed in order to derive demineralized bone sheet. Biochemical and morphological analyses were performed on the demineralized bone sheet. Rat maxillary first molars were extracted, and the animals were divided into five groups as follows: tooth extraction only, implant into the mesial root socket, implant and other root sockets covered with demineralized bone sheet, implant and other root sockets filled with demineralized bone powder under the sheet, and implant and other root sockets covered with demineralized bone sheet from which proteins were extracted. **Results:** Biologically active substances were detected in extracted proteins. Micro-CT imaging revealed that treatment with demineralized bone sheet alone or with powder under the sheet stimulated greater alveolar bone formation than the other treatments. Histochemical examination confirmed that demineralized bone sheets were the most effective stimulants of bone growth. **Conclusion:** Demineralized bone sheets improve alveolar bone height. Resorbable membranes with biologically active substances could facilitate socket preservation and augment alveolar bone growth around dental implants.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-37 口腔扁平上皮癌のグルコース代謝に対するジクロロ酢酸ナトリウム及び2-デオキシ-D-グルコースの抑制効果

○北村 淳^{1,2}, 鷲尾 純平¹, 森島 浩允^{1,2}, 高橋 哲², 高橋 信博¹

¹東北大学 院歯 口腔生化

²東北大学 院歯 顎顔面口外

【目的】

癌細胞は Warburg 効果として知られる解糖系の亢進を特徴とするエネルギー代謝機構を持ち、もし癌細胞の解糖系を抑制できれば、癌細胞の増悪をコントロールできる可能性がある。ジクロロ酢酸ナトリウム (DCA) と 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) は代謝阻害作用があるとされ、長時間曝露により細胞を死滅させる抗癌物質として研究が進められている。しかし、癌細胞の糖代謝に対するこれら薬剤の影響をリアルタイムに定量化した報告はない。そこで本研究では、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞を用い、グルコース代謝に対する DCA と 2DG の影響を検討した。

【方法】

OSCC 細胞として舌癌由来細胞株 HSC-2, 正常細胞としてヒト表皮角化細胞株 HaCaT を用いた。通法で培養し、0-30 mM DCA もしくは 0-2 mM 2DG 添加前後の 37°C, pH 7.5 におけるグルコース代謝活性を、pH stat 法を用いて 40 分間にわたり連続的に測定した。

【結果】

DCA は濃度依存的に代謝活性を抑制し、10 mM で、HSC-2 及び HaCaT の代謝活性を有意に抑制した (抑制率: $17.6 \pm 6.0\%$, $16.3 \pm 4.3\%$)。一方 2DG も濃度依存的に代謝活性を抑制し、2 mM で代謝活性は明確に抑制された (抑制率: $21.0 \pm 9.8\%$, $23.5 \pm 12.8\%$)。しかし、細胞間では有意な違いは認められなかった。

【考察】

本研究から、DCA と 2DG は細胞の糖代謝活性を抑制することが明らかになった。これまで、DCA や 2DG への長時間曝露により、白血病細胞や前立腺癌細胞株が死滅することが報告されている。癌細胞においては、DCA や 2DG による糖代謝の抑制が、その後の細胞の死滅を導く原因となる可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Inhibitory effects of sodium dichloroacetate and 2-deoxy-D-glucose on the glucose metabolism of oral squamous cell carcinoma

○Kitamura J^{1,2}, Washio J¹, Morishima H^{1,2}, Takahashi T², Takahashi N¹

¹Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Div Oral Maxillofac Surg, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Objective: It is generally accepted that cancer cells obtain energy efficiently through the enhancement of glycolysis (Warburg effect), suggesting that inhibition of glycolysis may suppress cancer cells. Sodium dichloroacetate (DCA) and 2-Deoxy-D-glucose (2DG), known as metabolism inhibitors, have been studied as anticancer agents to kill cancer cells by long-time exposure. However, their effects on the cancer cell metabolism were still unknown. Therefore, we attempted to elucidate these effects on the glucose metabolism of oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Materials and Methods: HSC-2 (human OSCC cell) and HaCaT (human epidermal keratinocyte) were used. The cultured cells were mixed with 0.5% glucose and 0-30 mM DCA or 0-2 mM 2DG, and the glucose metabolic activity at 37°C and pH 7.5 was monitored by the pH-stat system.

Result: DCA and 2DG inhibited the metabolic activity in a concentration-dependent manner. 10 mM DCA decreased the metabolic activity of HSC-2 and HaCaT by $17.6 \pm 6.0\%$ and $16.3 \pm 4.3\%$, respectively, while, 2 mM 2DG decreased by $21.0 \pm 9.8\%$ and $23.5 \pm 12.8\%$, respectively. However, there was no significant difference between these cells.

Conclusion: DCA and 2DG inhibited the glucose metabolism of cancer cells, suggesting that this inhibition may lead to the suppression and/or killing of cancer cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-38 ヒト歯髄細胞における lipopolysaccharide による HIF1a 発現の誘導

○藤井真由子, 川島 伸之, 興地 隆史

医科歯科大 院医歯 歯髄生物

【目的】炎症歯髄組織では、内圧亢進に伴う循環障害から容易に低酸素状態が生じることが想定される。Hypoxia Inducible Factor (HIF) 1a は低酸素状態の細胞内で誘導される転写因子であるが、その炎症時での動態は十分に解明されていない。そこで本研究では、ヒト歯髄細胞における HIF1a 発現に対する lipopolysaccharide (LPS) 刺激の影響を解析した。【方法】実験には健全抜去歯より分離したヒト歯髄細胞 (倫理審査番号 #948) を使用した。HIF1a の mRNA およびタンパク発現は、特異的プライマーを用いた rPCR および抗 HIF1a 抗体を用いた Western Blotting にて検討した。prolyl hydroxylase (PHD; HIF1a の分解に関与) の阻害薬として塩化コバルトおよび dimethylallyl glycine を、また NFκB の阻害薬として BAY11-7085 を使用した。【結果および考察】ヒト歯髄細胞における *HIF1a* mRNA 発現は LPS 非添加条件においても認められ、その発現は LPS 添加で有意に増加したが、BAY11-7085 存在下では LPS 添加の影響を認めなかった。従って、LPS 刺激による NFκB シグナルの活性化が、HIF1a mRNA 発現誘導に関与することが示唆された。一方、ヒト歯髄細胞における HIF1a タンパク発現は PHD 阻害薬非存在下では LPS 添加の有無によらず検出されなかったが、PHD 阻害薬存在下では LPS 添加により発現が認められた。PHD 活性は低酸素状態で低下することが知られているため、LPS 刺激は低酸素状態においてヒト歯髄細胞における HIF1a タンパク発現の誘導に関与している可能性が示唆された。【結論】LPS はヒト歯髄細胞における HIF1a の mRNA およびタンパク発現を誘導することが明らかになった。(研究協力: 奈良圭介, 野田園子, 橋本健太郎)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Induction of HIF1a in human dental pulp cells by lipopolysaccharide

○Fujii M, Kawashima N, Okiji T

Dept Pulp Biol & Endod, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Introduction: Dental pulp inflammation can result in an increase in intrapulpal pressure and subsequent ischemia accompanied with hypoxia. Hypoxia inducible factor (HIF) 1a is a transcriptional factor induced under hypoxic conditions, although its involvement in inflammation remains unclear. This study analyzed the effect of lipopolysaccharide (LPS) on HIF1a expression in human dental pulp cells (hDPCs). **Methods:** hDPCs were derived from extracted healthy human teeth (approved by the Ethical Committee of TMDU: #948). HIF1a mRNA and protein expression was analyzed by rPCR and Western blot, respectively. Cobalt chloride or dimethylallyl glycine was used as inhibitors of prolyl hydroxylase (PHD). BAY11-7085 was used as an NFκB inhibitor. **Results and Discussion:** LPS enhanced *HIF1a* mRNA expression in hDPCs which was blocked by BAY11-7085. This suggests that *HIF1a* mRNA is induced via NFκB signaling activated by LPS. On the other hand, HIF1a protein was not detected in the absence of PHD inhibitors, whereas it was detected in the presence of the PHD inhibitors in response to LPS. Since PHD activity is known to be decreased under hypoxic condition, these results suggest that LPS increases HIF1a protein synthesis in hDPCs under hypoxic condition. **Conclusion:** LPS induced HIF1a mRNA and protein expression in hDPCs. (collaborators: Nara K, Noda S, Hashimoto K)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-39 神経堤細胞分化誘導における発現遺伝子の解析

○佐藤 彩乃¹, 篠 宏美², 小野寺晶子², 齋藤 暁子², 一戸 達也¹, 東 俊文²

¹東歯大 院歯 麻酔

²東歯大 生化

【目的】神経堤は脊椎動物の発生初期において一時的に形成される構造であり、神経細胞、骨軟骨、そして歯を構成する象牙芽細胞や歯髓細胞などに分化することが知られている。しかし、iPS細胞から神経堤細胞、そして象牙芽細胞への分化メカニズムについては不明な点が多い。本研究では象牙芽細胞への分化機構解明の前段階として、マウス iPS 細胞から神経堤細胞への分化に関与する重要な転写因子を詳細に検討することを目的とした。【材料および方法】細胞はマウス iPS (miPS) 細胞 (APS0001 株) を使用。通法に従い、miPS 細胞用培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium に 15% KnockOut Serum Replacement, 1% Non-Essential Amin Acids, 1% L-Glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin, 0.11 mM 2-mercaptoethanol を添加) を用いてフィーダー細胞上に miPS 細胞を培養。0.25% trypsin-EDTA で剥離し、低接着性プレートに播種し胚葉体 (EB) を形成させた。EB 形成時の培地には神経誘導培地 (DMEM-F12: Neurobasal media を 1:1, 0.5×N2, 0.5×B27, 5 μg/ml Insulin, 20 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF, 1% Penicillin-Streptomycin を添加) を用い 4 日間浮遊培養した。Collagen コートプレートに EB を播種。Outgrowth 法により得られた細胞を Neural Crest Like Cells (NCLC) とした。継代の際、ロゼッタ状細胞は除去した。1 継代 (NCLC-P1), 2 継代 (NCLC-P2) の細胞を回収し、EB 形成 4 日目の細胞をコントロールとしてリアルタイム PCR にて神経堤マーカーの発現解析を行った。また、神経堤分化前および分化後の細胞において、mRNA-seq 解析を実施した。【結果および考察】リアルタイム PCR の結果より、FoxD3 発現量は EB 形成 4 日目において最も発現が高く、その後減少した。一方、Snail, Slug, Pax3 の発現量は、NCLC-P1, NCLC-P2 において著しく増加した。これらのことから、分化誘導時期により発現遺伝子に違いがあることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Analysis of the transcription factor while mouse iPS cells were differentiated into the neural crest cells

○Sato A¹, Shino H², Onodera S², Saito A², Ichinohe T¹, Azuma T²

¹Dept Dent Anesthesiol, Tokyo Dent Coll Grad Sch Dent

²Dept Biochem, Tokyo Dent Coll

Purpose: The neural crest is differentiated into various type of cells including odontoblast and pulp cell. We investigated transcription factors contribute in the odontogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem (miPS) cells. **Materials & Methods:** We used miPS cells which maintained on feeders in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 15% KnockOut Serum Replacement, 1% Non-Essential Amin Acids, 1% L-Glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin (P/S), and 0.11 mM 2-mercaptoethanol. Embryoid bodies (EBs) cultured in neural crest cells induction medium consist of 1:1 ratio of DMEM-F12 and Neurobasal media with 0.5×N2, 0.5×B27, 5 μg/ml Insulin, 20 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF, and 1% P/S. The cells which were provided by the outgrowth method called neural crest-like cells (NCLC). We collected NCLC of passage 1 (NCLC-P1) and passage 2 (NCLC-P2). The expression of neural crest marker were analyzed by real-time PCR. We carried out the comparison cells in undifferentiated state with neural crest differentiated cells using mRNA-seq analysis. **Result & Conclusion:** The expression of FoxD3 was the higher in the EB formation at fourth day, and subsequently it was decreased as differentiating. On the other hand, the expression of Snail, Slug, and Pax3 were remarkably increased in NCLC-P1 and NCLC-P2. These results were suggested that expression order of transcription factor might play an important role in odontogenesis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-40 ATDC5 細胞の軟骨分化におけるリゾリン脂質アシル転移酵素の働き

○田部 士郎^{1,2}, 引地 尚子³, 有吉 渉¹, 沖永 敏則¹, 西原 達次¹

¹九歯大 感染分子生物

²九歯大 顎顔面外科

³九歯大 口腔保健

【目的】生体膜の主成分であるグリセロリン脂質は、細胞機能の制御のために働いている。グリセロリン脂質は新規合成経路であるケネディー経路で合成され、それに続きランズ経路を介してリモデリングされる。リゾリン脂質アシル転移酵素群は近年発見された酵素群で、2つのそれぞれの経路において、細胞機能に適合させるためにグリセロリン脂質の脂肪酸組成を維持している。今回、われわれは軟骨細胞に分化する細胞を用いて、分化過程におけるリゾリン脂質アシル転移酵素群の役割について検討した。【方法】マウス AT805 奇形癌腫細胞由来の ATDC5 細胞を軟骨細胞に分化させ、リゾリン脂質アシル転移酵素群の遺伝子発現を RT-PCR で、酵素活性を液体クロマトグラフ質量分析計で解析した。続いて、軟骨細胞分化に伴い高発現したリゾリン脂質アシル転移酵素をノックダウンさせ、軟骨分化マーカーの遺伝子・タンパクの発現や機能的変化を検討した。【結果】数種類のリゾリン脂質アシル転移酵素群のうち、ATDC5 細胞が軟骨細胞に分化するのに伴い、LPCAT4 (リゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ 4) の遺伝子が高発現し、LPCAT 活性も増加した。また、LPCAT4 をノックダウンさせた ATDC5 細胞において、軟骨分化マーカーの遺伝子発現とタンパク発現が減少され、アルカリホスファターゼ活性も抑制された。【考察】リゾリン脂質アシル転移酵素の一つである LPCAT4 が、ATDC5 細胞の軟骨細胞分化に伴い発現が増加し、軟骨細胞の機能の維持に影響している可能性があることが示唆された。【利益相反】利益相反状態にはありません。

The role of lysophospholipid acyltransferases in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells

○Tabe S^{1,2}, Hikiji H³, Ariyoshi W¹, Okinaga T¹, Nishihara T¹

¹Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ

²Div Oral Maxillofac Surg, Kyushu Dent Univ

³Dept Oral Health Manage, Kyushu Dent Univ

Purpose: Glycerophospholipids are the main components of biomembranes, which play roles in regulating cellular functions. They are formed the de novo pathway (Kennedy pathway) and subsequently remodeled through the remodeling pathway (Lands' cycle). Lysophospholipid acyltransferases (LPLATs), which have been recently discovered, maintain the fatty acid composition of glycerophospholipids appropriate for cell functions in these pathways. In the present study, we examined the role of LPLATs in the chondrogenic differentiation. **Materials and Methods:** ATDC5 cells, which were derived from mouse AT805 teratocarcinoma cells, can be differentiated into chondrocytes. Gene expression of LPLATs and LPLATs enzymatic activity in these cells was analyzed by RT-PCR and liquid chromatography-mass spectrometry, respectively. Subsequently, gene and protein expression of chondrogenic differentiation markers, and the functional changes were analyzed in cells transfected with LPLAT siRNA during chondrogenic differentiation. **Results:** Gene expression of lysophosphatidylcholine transferase 4 (LPCAT4), one of LPLATs, was increased during chondrogenic differentiation. LPCAT enzymatic activity also increased. Knockdown of LPCAT4 decreased gene and protein expression of chondrogenic differentiation markers, and inhibited alkaline phosphatase activity. **Conclusion:** LPCAT4 expression was enhanced during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells, suggesting that this enzyme may play a role in the maintenance of function of chondrocytes.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-41 Tr1 分化における PI3 の役割

○Niken Adiba Nadya, 東 みゆき, 永井 重徳

医科歯科大 院医歯 分子免疫

Role of PI3K in Tr1 cells differentiation

○Niken A, Azuma M, Nagai S

Div Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Purpose: IL-10 producing type I regulatory T (Tr1) cell is one of the helper T (Th) subsets that has strong immunosuppressive properties and helps to control excessive inflammatory responses such as tissue inflammation or autoimmunity. Therefore, it is important to clarify the molecular mechanism of Tr1 differentiation for the regulation of the inflammatory responses, but it has not characterized yet. In this time, we investigated the signaling pathway related to Tr1 differentiation, especially focus on the role of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), a lipid kinase that generates phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) to transduce the cell activity such as translation or cell survival, including immune cells. **Materials & Methods:** CD25⁺ naturally occurring regulatory T (nTreg)-depleted conventional CD4⁺ T cells were isolated from BALB/c WT mice and stimulated with anti-CD3 ϵ and anti-CD28 Abs adding IL-27 in the presence or absence of PI3K inhibitors. After 3 days of incubation, the ratio of IL-10-producing cells was measured by FACS. **Results & Conclusion:** The differentiation of Tr1 cells was inhibited by PI3K inhibitors in a dose dependent manner only when we added the inhibitors on day 0, indicating that the activation of PI3K signaling pathway in the priming phase is required for Tr1 differentiation. We further examine the involvement of several molecules downstream of PI3K pathway on the differentiation of Tr1 cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-42 Cariogenicity of *Streptococcus mutans* UA159 in dental cavity is promoted by biofilm acidification via extracellular electron transfer

○Naradasu Divya¹, 岡本 章玄²

¹東大 院工 先端学際工学

²国立研究開発法人 物質・材料研究機構

Cariogenicity of *Streptococcus mutans* UA159 in dental cavity is promoted by biofilm acidification via extracellular electron transfer

○Divya N¹, Okamoto A²

¹Dept Advanced Interdisciplinary Studies (AIS) Div Engineering, Grad Sch, The Univ of Tokyo

²Natl Inst of Mater and Sci (NIMS)

Oral diseases like caries, gingivitis and periodontitis are caused by bacterial biofilm (plaque) formation on the surface of teeth, which promotes the dissolution of jawbone or teeth. One of the mechanisms for such bone loss is acidification of the calcium mineral surface by microbial flora, which has been considered, due to lactate (pKa 3.8) production, through sugars fermentation by *Streptococcus mutans*¹. However, the high activity of those microbes in such deep anaerobic conditions is remained ambiguous. Recently, Wanger, G. *et al.* proposed that biofilm in oral environment could be electrically conductive to couple anaerobic respiration with oxygen reduction outside of the biofilm. This possibility suggests that lactate accumulation may not be the main reason for biofilm acidification, because lactate could serve as an electron donor for anaerobic respirations. Biofilm having electrical conductivity is often composed of microbes capable of extracellular electron transfer (EET), in which microbes transfer metabolically generated electrons to external electron acceptors through an outer-membrane protein complex, shuttling mediators or bacterial nanowires³. In this study we examined the EET capability of the primary causative agent in human dental plaque, *Streptococcus mutans* UA159, by *in vivo* electrochemistry. *S. mutans*, facultative-anaerobically precultured in Brain heart infusion broth was used in three-electrode system consisted of an indium tin-doped oxide (ITO) substrate as the working electrode at 37°C containing 10mM glucose as sole electron donor. Upon the addition of *S. mutans*, current production was gradually increased with time at poised potential of +0.4V versus SHE in Time vs Current measurement, indicating the electron transfer between *S. mutans* and the electrode, coupling with the oxidation of glucose. It infers the EET capability of *S. mutans* and also suggests that cariogenic mechanism in oral biofilm could not be simply the acids accumulation, but may be more complex than the current consensus. We will present further data to discuss the acidification mechanism in the oral biofilm containing *S. mutans*.**References:**1. Loesche WJ. (1996) Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Chapter 99. 2. Wanger G *et al.* (2013) Electrically conductive bacterial nanowires in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw biofilms. *Oral and maxillofacial pathology*. 115(1):71-8. 3. C.I. Torres *et al.* (2010) A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria *FEMS Microbiol Rev* 34:3-17.**Acknowledgement:** This research work was conducted in Prof. Hashimoto Kazuhito laboratory, The University of Tokyo, Japan.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-43 成体マウスの切歯形成における TGF- β ファミリーの関与

○町谷亜位子^{1,2}, 自見英治郎³, 須田 直人², 片桐 岳信¹

¹埼玉医大 ゲノム 病態生理

²明海大 歯 矯正

³九歯大 分子情報生化

Transforming growth factor- β (TGF- β)ファミリーのシグナルは、上皮間葉相互作用による歯の発生に重要と考えられている。TGF- β ファミリーの成長因子は、活性化する細胞シグナルの違いで2群に大別される。1つは転写因子 Smad1/5 経路を活性化する Bone morphogenetic protein (BMP) を中心とした群で、他方は転写因子 Smad2/3 経路を活性化する TGF- β や Activin が分類される。Smad4 は、両方のシグナル伝達系に共通の転写共役因子である。切歯における TGF- β ファミリーの役割は、主に胎生期歯胚を対象に研究されており、成体の切歯形成における役割は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、成体マウスの切歯形成における TGF- β ファミリーの関与を検討するため、生後 13 週齢マウスの下顎骨矢状断切片を Smad4 特異的抗体で免疫染色した。その結果、切歯のエナメル芽細胞や象牙芽細胞は、Smad4 を高発現することが判明した。特に、エナメル分泌期以降では、エナメル芽細胞・星状網・乳頭層や象牙芽細胞で Smad4 の発現が高く、Cervical loop 領域の上皮系細胞・間葉系細胞も Smad4 の発現が高かった。転写共役因子 Smad4 が高発現していたことから、成体マウス切歯における TGF- β ファミリーシグナル分子の mRNA 発現量を RT-qPCR 法で解析した。その結果、切歯は頭蓋冠や大腿骨に比べ高レベルの TGF- β ファミリーのリガンド(BMP2, BMP4, BMP7, TGF- β 1, TGF- β 3) を発現し、さらに転写因子(Smad1-Smad9) の発現レベルも高かった。これらの結果から、Smad4 を介した TGF- β スーパーファミリーの細胞内シグナルは、胎生期の歯胚形成だけでなく、成体の切歯形成にも重要な役割を果たす可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Involvement of the TGF- β family in tooth development in adult mice

○Machiya A^{1,2}, Jimi E³, Suda N², Katagiri T¹

¹Div Pathophysiol, Res, Center for Genomic Medicine, Saitama Med Univ

²Div Orthod, Meikai Univ Sch Dent

³Div Mol Signal Biochem, Kyushu Dent Univ

Members of the transforming growth factor- β (TGF- β) family play important roles in epithelial-mesenchymal interaction during tooth development. The members are divided in two classes based on the downstream intracellular signaling. Bone morphogenetic proteins (BMPs) activate transcription factors Smad1/5, although TGF- β and Activin activate Smad2/3. Because Smad4 is a common co-activator of both Smad pathways, we analyzed the Smad4 levels in adult mice using a specific antibody against Smad4. We found that higher levels of Smad4 were detected in odontoblasts and ameloblasts. We further analyzed the expression levels of TGF- β family mRNAs in adult mouse incisor and other tissues, including calvaria and femur, by RT-qPCR analysis. The levels of BMP2/4/7, TGF- β 1/3, Smad1-9 in incisor were the highest in the tissues examined. These findings suggest that TGF- β family signaling through Smad4 is involved in tooth development in not only embryos but also adults.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-44 低分子量 G タンパク質 Cdc42 は PTH シグナルを介し胎生期および生後成長期の軟骨形成を制御している

○長濱 諒^{1,2}, 山田 篤¹, 榎 宏太郎², 上條竜太郎¹

¹昭大 歯 口腔生化

²昭大 歯 矯正

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質に属する Cdc42 は、アクチン細胞骨格の制御を介し、細胞の様々な機能に重要な役割を果たしていると考えられている。Cdc42 を主に軟骨細胞特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (Cdc42^{fl/fl}; Col2Cre) の解析より、Cdc42 が胎生期における軟骨形成に重要な遺伝子であることが示唆されたが、このマウスは、生後数日で致死となるため、成体の骨格形成に極めて重要な生後成長期軟骨形成における Cdc42 の機能は不明であった。そこで、薬剤(タモキシフェン)投与により時期特異的に軟骨細胞で Cdc42 遺伝子を欠損させるコンディショナルノックアウトマウス (Cdc42^{fl/fl}; Col2CreERT : Cdc42 cKO) を作製し、生後成長期の軟骨形成における Cdc42 の機能を検討した。Cdc42 cKO マウスはコントロールマウス (Cdc42^{fl/fl}) と比較し、生後 40 日齢までに、体重および体長に顕著な低下が認められた。また、長管骨成長板の組織解析から、肥大軟骨細胞層の肥厚、増殖軟骨細胞の柱状配列の乱れが認められた。さらに、軟骨形成に重要な役割を果たしている PTH/PTHrP 受容体を介する制御における Cdc42 の機能を検討するために、肋軟骨由来初代軟骨細胞に PTH(1-34) を処理した際の cAMP 産生量を測定したところ、Cdc42 cKO では有意に cAMP 産生量が減少した。以上の結果から、Cdc42 は生後成長期の軟骨形成に重要な役割を果たしていること、PTH/PTHrP 受容体を介した軟骨細胞分化制御に関与していることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Cdc42 is critical for cartilage development through PTH-mediated signaling

○Nagahama R^{1,2}, Yamada A¹, Maki K², Kamijo R¹

¹Dept Biochem, Showa Univ Sch Dent

²Dept Orthodont, Showa Univ Sch Dent

Cdc42, a member of the small Rho GTPase family, has been shown to be a regulator of multiple cellular functions *in vitro*. However, its tissue-specific roles remain largely unknown, especially in postnatal cartilage development, as cartilage-specific Cdc42 inactivated mice die within a few days after birth. The purpose of this study was to investigate the physiological functions of Cdc42 during cartilage development after birth using tamoxifen-induced cartilage-specific inactivated Cdc42 conditional knockout (Cdc42^{fl/fl}; Col2-CreERT; Cdc42 cKO) mice. The gross morphology of Cdc42 cKO mice was shorter limbs and body, as well as reduced body weight. In addition, severe defects were found in growth plate chondrocytes of the long bones, which were characterized by wider hypertrophic zone and loss of columnar organization of proliferating chondrocytes, resulting in delayed endochondral bone formation associated with abnormal bone growth. We also examined the function of Cdc42 via the PTH/PTHrP receptor, which plays an important role in cartilage formation. Measurements of the amount of cAMP produced after processing PTH in chondrocytes showed a significant decrease in production of cAMP in the Cdc42 cKO mice. Our findings demonstrate the importance of Cdc42 for cartilage development during both the embryonic and postnatal stages.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-45 咀嚼刺激の低下は顎口腔組織の成長を抑制し記憶学習障害を誘発する

○福島由香乃^{1,2}, 小野 岳人¹, 小野 卓史², 中島 友紀^{1,3,4}

¹医科歯科大 院医歯 分子情報伝達

²医科歯科大 院医歯 咬合機能矯正

³科学技術振興機構 さきがけ

⁴日本医療研究開発機構 革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST)

咀嚼行動は効率的な消化吸収に重要なだけでなく、認知学習機能低下の予防に有効であると考えられている。近年、マウスにおいて軟食飼育による咀嚼刺激の低下が海馬をはじめとする脳神経系の発達を妨げ認知機能や学習障害を引き起こすことが示された。しかしながら、その詳細なメカニズムに関しては不明な点が多い。我々は、成長期における咀嚼刺激の低下がどのようなメカニズムで脳機能の発達に影響を及ぼすかを解明するため、軟食飼育により咀嚼刺激が低下したマウスの個体行動を行動生理学的手法により評価した。さらに、海馬および大脳皮質の組織学的・機能的変化を検討した。軟食飼育したマウスを実験群、通常固形食で飼育したマウスをコントロール群とした。咀嚼刺激を低下させた実験群では、コントロール群と比較して体重の差は認められなかったが、顎骨と咀嚼筋、特に閉口筋の成長が抑制されていた。明暗箱試験、物体位置認識試験による行動解析では、咀嚼刺激低下マウスにおいて認知学習機能の低下が見出された。これらのマウスでは、海馬において記憶に関わる分子である Bdnf や Creb の遺伝子発現が低下していた。さらに、海馬の神経細胞数の減少と細胞増殖の指標となる BrdU 陽性細胞数、記憶に関わる初期反応因子である c-Fos 陽性細胞数の減少も認められた。以上より、成長期における咀嚼刺激の低下は、顎骨および咀嚼筋の成長を抑制し、海馬や脳神経系の発達を妨げることで認知学習機能を障害することが示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Reduced mastication impairs mandibular growth and memory

○Fukushima Y^{1,2}, Ono T¹, Ono T², Nakashima T^{1,3,4}

¹Div Cell Signal, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Div Ortho Sci, Oral health Sci, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

³Precursory Res for Embryonic Sci Technol (PRESTO), Japan Science and Technology Agency (JST)

⁴Japan Agency for Medical Research and Development, Core Research for Evolutional Science and Technology (AMED-CREST)

Mastication is important not only for digestion but also for the prevention of cognitive impairment. Recently, the hardness of food is shown to be influential on the development of the nervous system. However, the molecular mechanism linking mastication and memory/learning function has not been thoroughly elucidated. In this study, we analyzed the effects of reduced mastication on the development of nervous system and function. We fed juvenile mice with soft diet, which reduces mastication, and examined behavioral characteristics. The mRNA expression of memory-related genes, and the number of cells in the hippocampus and cerebral cortex were analyzed. Although there was no significant difference in body weight between the control and experimental groups, the mandible and masticatory muscles were smaller in experimental group. Passive avoidance test and object location test revealed that the memory function was reduced; mRNA expression of neurotrophic factors was significantly reduced in these mice. Immunohistological analysis showed that the numbers of BrdU positive cells and c-Fos positive cells in hippocampus of the experimental group were reduced. These findings indicate that the reduced mastication induced by soft diet in the early stage of development results in the impairment of mandibular development and spatial memory and learning function.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-46 cadherin/catenin シグナルを介した MMP-20 のエナメル質形成制御機構

○進 正史¹, 岡本富士雄¹, 鍛冶屋 浩¹, 緒方佳代子¹, 岡部 幸司¹

¹福歯大 細胞生理

²オハイオ州立大 歯 生物科学

【目的】 Matrix Metalloproteinase-20 (MMP20: enamelysin) は分泌期のエナメル芽細胞に高発現する。ヒト MMP20 遺伝子 (MMP20) の変異はエナメル質形成不全症を引き起こし, Mmp20 欠損マウスはエナメル質タンパクの分解不正やエナメル質層の剥離が認められる。我々は MMP20 が細胞間接着分子である cadherin を分解することを明らかにしており, さらに MMP20 と cadherin/catenin シグナルとの関連を MMP20 過剰発現の実験系を用いて検討した。【方法と結果】 まず, エナメル芽細胞由来細胞株に Mmp20 を過剰発現させた細胞株を樹立し, *in vitro* 解析を行った。この細胞株では細胞浸潤が亢進しており, 細胞間接着が失われると共に cadherin/catenin 複合体を形成する β -catenin の核内集積が認められた。Mmp20 遺伝子をエナメル芽細胞に特異的な遺伝子である Amelogenin プロモーターの下流に組換えたトランスジェニックマウス (Mmp20Tg) を作製し, MMP20 の *in vivo* 解析を行った。その結果, Mmp20 欠損マウスへの transgene 発現は, そのエナメル質形成不全を改善させた。一方, 正常な野生型マウスへの過剰発現では意外なことにエナメル質形成の著しい低下が認められた。この Mmp20Tg マウスの切歯では薄いエナメル質様の構造がエナメル質外層と象牙質上に発現し, その中間に細胞層の浸潤やコラーゲンを含む骨様石灰化物が認められた。また, 野生型マウスのエナメル芽細胞では β -catenin は細胞膜上に発現したが, Mmp20Tg マウスでは β -catenin は核内に強い発現が認められた。【結論】 MMP20 の過剰発現は cadherin 分解や β -catenin 核内移行を介して, エナメル芽細胞等の組織浸潤を促進し, エナメル質形成不全を呈すると考えられた。従って, MMP20 欠損でのエナメル質形成不全と合わせて, MMP-20 の至適発現量が cadherin/catenin シグナルとエナメル質形成機構の連携に重要であることが示唆された。(共同研究者 オハイオ州立大学 John Bartlett)

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

MMP-20 regulates enamel development via cadherin/catenin signaling

○Shin M¹, Okamoto F¹, Kajiya H¹, Ogata K¹, Okabe K¹

¹Div Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll

²Div Biosci, Ohio State Univ

Purpose: Matrix Metalloproteinase-20 (MMP20) is expressed in teeth. Mutations in MMP20 cause amelogenesis imperfecta and Mmp20 ablated mice have hypoplastic enamel. We sought to determine how Mmp20 over-expression results in enamel malformation. **Materials & Methods:** Mmp20Tg mice were characterized by western blots, histological analyses and qPCR. **Results & Conclusion:** Transgenic mice that use the amelogenin promoter to drive Mmp20 expression (Mmp20Tg) in the Mmp20 ablated background, significantly improved the physical properties of their enamel. When the transgene was present in the wild-type (WT) background, the enamel became malformed. Incisors from Mmp20+/+ mice expressing the Mmp20Tg had a massive cell infiltrate which occupied a large area within the enamel space. A thin layer of enamel-like material remained over the dentin and at the outer enamel surface, but between these regions were numerous cells and ectopic bone-like calcifications. Instead of predominantly locating adjacent to the ameloblast cell membrane, β -catenin was predominantly present within the nuclei of the invading cells. MMP20 overexpression increased cadherin cleavage and β -catenin release from cadherin complexes. The released β -catenin appeared to translocate to ameloblast nuclei, which promoted cell migration/invasion. Therefore, we conclude that MMP20 overexpression promotes a massive cell migration into the forming enamel layer through cadherin/catenin signaling.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-47 新規歯肉血流計測技術の開発：ヒト歯肉微小循環の加齢変化

○大杉 侑子, 永嶋 義直, 中津 晋, 佐藤 佳昌, 千葉 厚子, 藤中 英剛, 矢納 義高, 仁木 佳文

花王 パーソナルヘルスケア研

【背景】現在、歯肉表面の血流量を非接触、連続的かつ二次元的に計測でき、個体間比較ができる機器はない。そこで本研究では、既に報告した眼底血流を計測するレーザースペckル血流計 (LSFG) (Lee M.-C., 2003)を参考にして、歯肉血流を計測する LSFG を試作した。測定例として、健常男性被験者の歯肉血流と年齢との関係について検討した。

【方法】20-60 歳代の健常男性 (45.4 ± 14.3 歳, $N = 126$) を対象に、歯肉血流(上顎前歯部)、血圧、心拍数を計測した。組織血流量の指標である Mean Blur Rate (MBR) の算出及び心拍に伴う血流波形解析を行い、血流上昇時の加速度 (FAI: Flow Acceleration Index)、血流波形のピーク位置 (ATI: Acceleration Time Index)、血流量の下降速度の時間変動 (Falling Rate)、高い血流量の持続性 (BOT: Blowout Time) の指標となる血流波形パラメータを算出した。

【結果】歯肉の MBR は、既に報告した LSFG の速度較正器により計測した速度と正の相関関係を示す範囲内に分布しており、本測定法の MBR が歯肉においても血流量を示す指標として有効であることが示された。歯肉の MBR は、被験者の年齢と負の相関関係を示した ($p < 0.05$)。心拍に伴う血流波形においては、被験者の年齢上昇に伴い、血流上昇時の加速度の低下 (FAI, $p < 0.01$)、ピーク到達時刻の遅延 (ATI, $p < 0.01$)、ピーク到達後の血流下降速度の時間変動の上昇 (Falling Rate, $p < 0.01$)、高い血流の持続性の低下 (BOT, $p < 0.01$) が認められた。これらの結果から、加齢に伴い血液の歯肉組織への流入速度が低下する一方で、流出速度は上昇し、歯肉組織の血流量を維持する能力が低下することが示唆された。

【結論】本研究により、LSFG が歯肉血流計測に妥当であることが確認された。また、加齢に伴い歯肉組織の血流量を維持する能力が低下することが示され、本計測法がオーラルヘルスケア研究に有用であることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Development of a novel gingival blood flow measurement technique: Age-related changes in gingival microcirculation in humans

○Ohsugi Y, Nagashima Y, Nakatsu S, Sato K, Chiba A, Fujinaka H, Yano Y, Niki Y

Personal Health Care Products Res, Kao Corp

At present, there are no techniques for non-invasively obtaining serial gingival blood flow (GBF) measurements. The present study was undertaken to develop a laser speckle flowgraphy (LSFG)-based method for measuring gingival blood flow, which was then used to assess the age-related changes in the gingival microcirculation in healthy Japanese males ($N = 126$). The GBF of the maxillary anterior gingiva, blood pressure, and heart rate at rest were monitored. The mean blur rate (MBR), an index of GBF, and various pulse waveform parameters, including the flow acceleration index (FAI, the degree of acceleration on an increase in blood flow) and the blowout time (BOT, which measures the persistency of a high blood flow) were calculated. As the MBR was positively correlated with the velocity measured with an LSFG-based speed calibrator, it is suggested that MBR is a valid indicator of GBF. MBR was negatively correlated ($p < 0.05$) with the subjects' age. As for the pulse waveform parameters, FAI and BOT both fell ($p < 0.01$) as the subjects' age increased, indicating that GBF degenerates with aging. It is suggested that LSFG is a useful technique for evaluating GBF, and this technique is expected to be applied to oral healthcare research.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-48 大気圧センサを用いた咽頭内圧測定システムによる嚥下機能の評価

○長谷川真奈^{1,2}, 岡本圭一郎¹, 黒瀬 雅之¹, 山田 好秋³, 藤井 規孝², 山村 健介¹

¹新潟大 院医歯 口腔生理

²新潟大 医歯病 歯総診

³東歯大 口科研

嚥下機能を定量的に評価するため、多くの測定システムが開発されてきた。口腔咽頭圧測定もその1つである。今回、我々は高精度の小型大気圧センサを用いた口腔咽頭内圧測定システムを開発し、嚥下に伴う咽頭内の“空気圧”の変化を計測した。健常被験者の中咽頭に経鼻的に大気圧センサを留置した。被験者には、唾液、15 ml、45 mlの水・2種類の粘性の異なる液体を1回で嚥下するように指示し、発生する咽頭内圧と筋活動を同時記録し、応答を定量した。すべての嚥下運動において一過性に咽頭内圧の上昇を認めた。液体嚥下群では、全試行の99%で二相性の圧変化(Early, Late phase)を示したが、唾液嚥下では9%であった。液体嚥下群のEarly, Late phaseそれぞれについて、Area Under Curve (AUC)、ピーク、圧上昇時間を分析した。液体嚥下群のLate phaseの圧変化(AUC, ピーク, 時間)はEarly phaseより有意に大きかった。Early phaseの圧変化は量依存性に変化した。Late phaseは液体の量の影響を受けない一方、粘性が高い程、ピークが増大し、持続時間が短縮された。また液体嚥下群のLate phaseと唾液嚥下は圧変化に有意な差がなく、同一性が示唆された。筋活動は量依存性の増加を認めるも、粘性の影響を受けなかった。Early phaseの圧がピークとなるタイミングは筋活動のピークにはほぼ一致し、Late phaseの発現はその後であった。以上の結果より、唾液、液体嚥下に伴う咽頭圧変化はそれぞれ単相性、二相性の変化を示し、二相性の圧変化は、嚥下時の舌による食塊の送り込みや、咽頭の収縮といった複雑な口腔咽頭機能が連動する結果を反映する可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Measurements of baropressure in the pharynx during swallowing in the healthy subjects

○Hasegawa M^{1,2}, Okamoto K¹, Kurose M¹, Yamada Y³, Fujii N², Yamamura K¹

¹Div Oral Physiol, Niigata Univ Grad Med Dent Sci

²General Dent Clinic Edu Unit, Niigata Univ Med Dent Hosp

³Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll

Evidence supports the notions that pressure changes in the pharynx reflect the swallowing function. We have developed a new device to better understand the changes of baropressure by transducers in a balloon to assess the swallowing function. Baropressure was measured in the mid-pharynx from 15 healthy subjects. Swallowing tasks (saliva, 15 and 45 ml water, and thickened water) were performed with simultaneous EMG recordings from the suprahyoid muscles. Increases in positive pressure were observed in all tasks. Bolus swallowing displayed biphasic responses that consisted of the early and late phases. Increases in pressure for the late phase were greater than that for the early phase. Greater responses by 45 ml than 15 ml water in the early but not late phase indicated that early phase could be dependent on the volume of bolus. Thickened water displayed increases in peak pressure in both phases, while decreases in duration of the late phase. Intraparyngeal pressure that displayed peak amplitude for both phases was followed by peak EMG responses. These results suggest that baropressure changes in the early and late phases could reflect oral and pharyngeal functions likely corresponding to tongue driving pressure and pharyngeal contraction during swallowing.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-49 急性歯髄炎により誘導される歯痛錯誤の末梢神経機構

○古宮 宏記¹, 篠田 雅路², 岩田 幸一², 小木曾文内¹

¹日大 歯 保存 II

²日大 歯 生理

【目的】急性歯髄炎に伴う歯痛錯誤は、適切な診断と治療を行う上で大きな問題となる。このような異所性疼痛のメカニズムとして侵害受容ニューロンの異常興奮が考えられているがその詳細は不明である。本研究では、急性歯髄炎によって引き起こされる歯痛錯誤発症における末梢神経機構の一端を解明することを目的とした。【材料及び方法】右上第一臼歯歯髄(M1)内へのCFA投与3日目で、ラットを浅麻酔し、その後、同側顎二腹筋に双極電極を挿入し筋放電量が安定するまで静置し、同側第二臼歯(M2)を露髄させ髄腔内にCapsaicin投与を行った。それぞれの群で投与前後の反射性顎二腹筋活動を経時的に計測し筋活動量の解析を行った。また、M1へのCFA投与およびM2へのFG投与3日目に、ラットを麻酔し、灌流固定を行った。その後、三叉神経節内でSatellite細胞の活性化マーカーであるGFAPおよびCx43発現を免疫組織学的手法にて検索し、GFAPおよびCx43陽性細胞に取り囲まれたFG陽性細胞数について解析を行った。さらに、歯髄炎モデルラットのTG内にCx43阻害薬(Gap26)を、CFA投与前3日より7日間持続投与し、M2へのCapsaicin刺激後の反射性顎二腹筋活動を経時的に計測し解析を行った。【成績】反射性顎二腹筋活動はCFA群で有意な増加を示した。Cx43を発現しているGFAP陽性細胞によって囲まれたFG陽性神経節細胞数の割合はCFA群で有意に多かった。TG内へのGap26投与により、反射性顎二腹筋活動は有意に抑制された。【結論】M1歯髄炎はM2に痛覚過敏が引き起こすことが示された。発症メカニズムの一つとして、M1の炎症により三叉神経節内でのSatellite細胞の活性化およびそれに引き続くCx43の発現増加によって活性型Satellite細胞がM2支配神経節細胞周囲にまで波及し、M2神経節細胞活動を亢進し、M2の痛覚過敏が引き起こされたと考える。活性型Satellite細胞の拡散にはSatellite細胞に存在するCx43が関与する可能性が示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Satellite cell involvement in ectopic tooth-pulp pain associated with acute pulpitis

○Komiya H¹, Shinoda M², Iwata K², Ogiso B¹

¹Dept Endodont, Nihon Univ Sch Dent

²Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

Background: The purpose of the present study is to evaluate the mechanisms underlying ectopic tooth-pulp pain associated with acute pulpitis. **Methods:** Complete Freund's adjuvant (CFA) or saline was applied to the upper first molar tooth pulp (M1) in rats under the 3-mix-anesthesia, and capsaicin was applied to the upper second molar tooth pulp (M2) on day 3. Fluorogold (FG) neuronal tracing study was conducted to assess if there are any trigeminal ganglion (TG) neurons innervating multiple tooth pulps. Digastric muscle (Dig) EMG activity was also analyzed to evaluate if M2 capsaicin administration enhances jaw reflex. **Results:** Dig EMG activity was significantly larger in M1 CFA-applied rats compared with M1 saline-applied rats. The number of FG-labeled neurons encircled with glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Connexin43 (Cx43)-IR cells in TG was significantly larger in M1 CFA-applied rats compared with M1 saline-applied rats. Application of Cx43 cell inhibitor (Gap26) into TG caused significant reduction of capsaicin-induced Dig activity, and satellite cell and Cx43 activation. **Conclusions:** These findings suggest that M1 pulpitis causes spreading of satellite cell activation within TG under the mechanisms of Cx43 activation, resulting in M2 pulp hypersensitivity.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-50 象牙芽細胞におけるアルカリ感受性 store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)

○木村 麻記, 佐藤 正樹, 小島 佑貴, 東川明日香, 隴田みゆき, 小倉 一宏, 望月 浩幸,
河野 恭佑, 田崎 雅和, 澁川 義幸

東歯大 生理

象牙質形成や感覚受容機構における象牙芽細胞の Ca²⁺シグナルは、細胞外刺激誘発性 Ca²⁺流入と細胞内ストアからの Ca²⁺放出によって調節される。我々は以前、ストアからの Ca²⁺放出によりストア内 Ca²⁺が枯渇すると、細胞外からの Ca²⁺流入 (store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)) が生じることを報告した (Shibukawa and Suzuki, 2003)。しかしながら、その詳細な活性化過程、活性化分子機構、薬理学的特性は不明である。そこで本研究では、象牙芽細胞における SOCE の薬理学的特性を検討した。新生仔ラット切歯から得た急性単離象牙芽細胞に fura-2 を負荷し細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 測定を行った。細胞外 Ca²⁺非存在下で、Ca²⁺ストア膜上の Ca²⁺-ATPase を阻害する thapsigargin (TG) を投与すると一過性に [Ca²⁺]_iが増加した。[Ca²⁺]_iが静止レベル付近まで戻った後、2.5 mM Ca²⁺を含む Krebs 溶液を投与すると [Ca²⁺]_iが増加した。その増加は Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CARC) チャネル阻害薬である BTP2 と synta66 で抑制された。TG の前投与後、Krebs 溶液により誘発された SOCE は非選択的な CRAC チャネル阻害薬である lanthanum で抑制された。TG の前投与後、2.5 mM Ca²⁺を含むアルカリ溶液 (pH 9) を投与すると [Ca²⁺]_iが増加した。その増加は TRPA1 チャネル阻害薬の HC030031 で抑制され、その振幅は pH 7.4 の 2.5 mM Ca²⁺投与時と比べて大きかった。象牙芽細胞において Ca²⁺ストア内の Ca²⁺の枯渇はアルカリ感受性を示す SOCE を活性化することが示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Alkali sensitive store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) in rat odontoblasts

○Kimura M, Sato M, Kojima Y, Higashikawa A, Shimada M, Ogura K, Mochizuki H, Kono K,
Tazaki M, Shibukawa Y

Dept Physiol, Tokyo Dent Coll

Ca²⁺ signaling in dentin formation and/or sensory transduction in odontoblasts is mediated by two closely related components: Ca²⁺ release from intracellular Ca²⁺ stores and external stimuli-elicited Ca²⁺ influx from extracellular medium. In a previous study, we have reported that the depletion of Ca²⁺ stores by Ca²⁺ release induced store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) in odontoblasts. However, their detailed process and molecular mechanism for activation as well as pharmacological properties of SOCE remain unclear. In this study, we investigated the pharmacological properties of SOCE in acutely isolated odontoblasts. Odontoblast marker protein-positive cells were isolated from the incisors of newborn Wistar rats, and intracellular free calcium concentration ([Ca²⁺]_i) was measured using fura-2. In the absence of extracellular Ca²⁺, thapsigargin (TG) increased [Ca²⁺]_i. After [Ca²⁺]_i returned to the near-resting levels, Krebs solution containing 2.5 mM Ca²⁺ (pH 7.4) increased [Ca²⁺]_i. Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel inhibitors suppressed the increases. After pretreatment of TG, alkaline solution containing 2.5 mM Ca²⁺ induced [Ca²⁺]_i increases which were suppressed by TRPA1 channel antagonist. The amplitudes were larger than those with Krebs solution with 2.5 mM Ca²⁺ (pH 7.4). These results suggested that the store depletion activates SOCE in odontoblasts, which are sensitive to alkali environment.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-51 矯正力負荷下の歯根膜刺激に対する大脳皮質の神経応答

○堀貫 恵利^{1,2}, 清水 典佳¹, 越川 憲明², 小林 真之²

¹日大 歯 矯正

²日大 歯 薬理

【目的】矯正治療による歯の移動に伴う痛みは、矯正治療中にしばしば遭遇する愁訴である。我々は、矯正力負荷によって生じる疼痛が高次脳に及ぼす影響について検討した。その結果、矯正力負荷 1 日後の大脳皮質感覚野において歯根膜刺激によって誘発される神経応答が著しく増大することを明らかにした。しかし、その増大した応答が持続する期間を明らかにした報告はなかった。これは矯正力が高次脳に可塑的变化を生じさせるか否かという、臨床に深くかかわる問題である。そこで本研究は、上顎臼歯に実験的矯正力を加えたラットを作製し、歯根膜刺激に対する大脳皮質での神経活動の経時的変化を明らかにすることを目的とした。【方法】SD ラットに closed coil spring で右側上顎第一臼歯と上顎切歯を接続し、50 g の矯正力を負荷したモデル動物（矯正力負荷群）を作製した。ウレタン麻酔下にて、上顎臼歯歯根膜に双極電極を挿入し固定した後、ラット左側頭部皮質を露出させ、膜電位感受性色素 RH1691 を負荷した。歯根膜の電気刺激に対する大脳皮質神経活動は、実体顕微鏡に CCD カメラを搭載した光学計測システムを用いて記録した。矯正力負荷群は処置 1 日後、3 日後および 7 日後に光学計測を行った。【結果】矯正力負荷 1 日後では、対照群と比較して上顎臼歯刺激に対する応答の最大振幅と最大応答領域が有意に増大していた。3 日後に応答は減少し、7 日後には対照群と同程度の応答に戻った。【考察】歯根膜への持続的な機械刺激によって、矯正力負荷 1 日後では歯根膜刺激への応答が亢進するが、7 日後には回復することがわかった。このことから、矯正力によって大脳皮質での長期的な可塑的变化は生じないことが明らかとなった。また、矯正力負荷後の大脳皮質神経活動が、臨床における矯正治療中の痛みと類似した経時的変化を示すことから、本実験で観察した現象は矯正治療中の痛みを反映している可能性がある。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Sequential changes in rat cortical responses to periodontal stimulation during experimental tooth movement

○Horinuki E^{1,2}, Shimizu N¹, Koshikawa N², Kobayashi M²

¹Dept Orthodont, Nihon Univ Sch Dent

²Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent

Pain and discomfort induced by tooth movement during orthodontic treatment are major problems for patients. Our previous studies have demonstrated that cortical excitatory propagation induced by stimulation of the periodontal ligament (PDL) is significantly facilitated one day after experimental tooth movement (ETM). However, no information is available about the temporal profiles of the facilitated cortical responses. We investigated a sequential change in the cortical responses to stimulation of the maxillary 1st molar PDL during ETM to examine whether orthodontic force induces neuroplastic changes in the somatosensory and insular cortices. To apply orthodontic force in ETM models, the maxillary incisors and the right first molar were bound with a closed coil spring. Optical imaging was performed at 1 day, 3 days, and 7 days after ETM. One day after ETM, cortical excitatory propagation was facilitated in comparison with controls, and the facilitation gradually recovered to the control level 3 to 7 days after ETM. These results suggest that orthodontic force does not induce a long-lasting neuroplastic change in somatosensory and insular cortices. The temporal profile of the facilitated cortical responses is comparable to that of the orthodontic pain, suggesting that these cortical areas encode the orthodontic pain.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-52 セロトニン¹は 5-HT_{2A}受容体を介して NMDA 受容体機能を調節し咬筋運動ニューロンのグルタミン酸応答を増大する

○壇辻 昌典¹, 中村 史朗¹, 中山希世美¹, 望月 文子¹, 清本 聖文¹, 尾関 雅彦²,
井上 富雄¹

¹昭大 歯 口腔生理

²昭大 歯 インプラント

【目的】咬筋運動ニューロン (MMN) は巨大な樹状突起を持ち、反射性の感覚入力や吸啜、咀嚼などの運動指令など豊富な興奮性のグルタミン酸性入力を受ける。縫線核セロトニンニューロンは、咀嚼、呼吸、歩行などのリズムカルな運動時に活性化し、関連する運動ニューロンの活動性を調節すると考えられている。しかし、5-HT 入力¹がグルタミン酸性入力をどのように調節するのかは明らかでない。そこで本研究では、幼若期ラット MMN 樹状突起上の限局したグルタミン酸応答に対するセロトニン投与の影響を解析した。【方法】生後 2-5 日齢の Wistar 系ラットを用いて三叉神経運動核を含む前頭断脳幹スライス標本を作製し、逆行性蛍光レーザーで標識された MMN からホールセルパッチクランプ記録を行った。灌流投与したケージドグルタミン酸に、波長 365nm の窒素パルスレーザーまたは 730nm の 2 光子励起レーザーを照射して、グルタミン酸を樹状突起において局所的に解離した。細胞体に誘発されたグルタミン酸性の電位応答に対して、各種受容体刺激薬および拮抗薬の効果を検討した。【結果】5-HT の投与は、MMN の膜電位を上昇させ、レーザー照射によるグルタミン酸応答の振幅を濃度依存的に増大した。5-HT_{2A}受容体刺激薬の投与は 5-HT と同様の効果を示し、5-HT_{2A}受容体拮抗薬により 5-HT の効果は抑制された。また、5-HT によるグルタミン酸応答の増大効果は NMDA 受容体拮抗薬の投与で消失したが、AMPA 受容体拮抗薬では残存した。さらに、免疫電子顕微鏡法を用いて MMN 樹状突起上に 5-HT_{2A}受容体と NMDA 受容体が存在することを確認した。以上の結果から、セロトニンは 5-HT_{2A}受容体を介して NMDA 受容体機能を調節し咬筋運動ニューロンのグルタミン酸応答を増大することが示唆された。(会員外共同研究者;Y.C.Bae, S.K.Park)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Serotonergic modulation of glutamate-evoked responses through 5-HT_{2A} receptors in the dendrites of rat jaw-closing motoneurons

○Dantsuji M¹, Nakamura S¹, Nakayama K¹, Mochizuki A¹, Kiyomoto M¹, Ozeki M²,
Inoue T¹

¹Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent

²Dept Implant Dent, Showa Univ Sch Dent

Masseter motoneurons (MMNs) have the well-developed dendrites where MMNs receive a variety of inputs. MMNs receive both glutamatergic and serotonergic inputs in the dendrites; however it is unclear how two inputs interact with each other. We made whole-cell patch clamp recordings from retrogradely-labeled MMN using the brainstem slices obtained from postnatal day 2-5 rats. MNI-caged glutamate was added to the bathing solution, and focal photolysis of caged glutamate was accomplished using a 365 nm nitrogen-pulsed laser or 730 nm two photon laser irradiation. Bath application of 5-HT increased the amplitude of the laser-evoked responses in the dendrites of the MMNs in a dose-dependent manner, in addition to depolarization of the membrane potential. 5-HT-induced enhancement of the laser-evoked responses was mimicked by application of the 5-HT_{2A} receptor agonist and antagonized by the 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist. The 5-HT-induced enhancement was suppressed by NMDA receptor antagonist, but not by the AMPA receptor antagonist. Immunoelectron microscopy revealed that both NMDA receptors and 5-HT_{2A} receptors were located in the dendrites of the MMNs. These results suggest that 5-HT enhanced the NMDA receptor-mediated glutamate responses in the dendrites of the MMNs through 5-HT_{2A} receptors. 5-HT may enhance the glutamatergic motor command onto MMN.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-53 2型糖尿病モデルマウスにおける唾液分泌能の解析

○宗政 翔¹, 近藤 祐介¹, 向坊 太郎¹, 楠田優一郎¹, 宮城 勇大¹, 柄 慎太郎¹,
正木 千尋¹, 中本 哲自², 細川 隆司¹

¹九歯大 口腔再建リハ

²松歯大 補綴

糖尿病は口腔乾燥症と関連があるとされるが、その詳細は不明である。本研究では2型糖尿病モデルマウスの唾液腺機能を評価することで、糖尿病が口腔乾燥症を引き起こすメカニズムを解明することを目的とした。糖尿病モデルマウスとしてKK-A^yを、コントロールとしてC57Bl/6Jを用いた。唾液腺水分分泌機能の評価には、Ex vivo 顎下腺灌流モデルを用いてムスカリン性刺激薬であるCarbachol (CCh) 刺激による唾液分泌量、唾液中イオン濃度 (Na⁺, Cl⁻) およびグルコース濃度を測定した。さらに、それぞれの組織中の腺房細胞と導管細胞の面積率をHematoxylin-Eosin染色切片を用いて計測した。加えて、Fura-2 AM を導入した分散細胞を用い、CChもしくはThapsigarginによる細胞内Ca²⁺濃度の上昇を評価した。KK-A^yではコントロールと比べCChによる唾液分泌量が有意に低下し、唾液中のNa⁺およびCl⁻濃度は有意に低値を示した。また、唾液中グルコース濃度はKK-A^yで有意に高値を示した。組織学的にはKK-A^yで導管細胞容積が上昇していたが、腺房細胞容積はKK-A^yとコントロールの間に差はなかった。CCh刺激による細胞内Ca²⁺の上昇は、細胞外Ca²⁺の有無に関係なくKK-A^yにおいて有意に低値を示した。一方でThapsigarginによる細胞内Ca²⁺上昇に差はなかった。以上の結果より、KK-A^yでは小胞体からのCa²⁺放出が障害されることで細胞内Ca²⁺濃度の上昇が抑制され、唾液分泌能が低下しており、その原因として高血糖に起因する小胞体ストレスの関与が示唆された。また導管細胞の増加に伴うイオンの再吸収の亢進が唾液中Na⁺およびCl⁻濃度の低下に関与することが考えられた。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Functional analysis of saliva secretion in type 2 diabetic mouse model

○Munemasa T¹, Kondo Y¹, Mukaibo T¹, Kusuda Y¹, Miyagi Y¹, Tsuka S¹, Masaki C¹,
Nakamoto T², Hosokawa R¹

¹Div Oral Reconstr Rehabil, Kyusyu Dent Univ

²Dept Prosthodont, Matsumoto Dent Univ

Xerostomia has been reported to be closely associated with diabetic mellitus. We have analyzed salivary gland function in a diabetes mouse model to explore how diabetes induces xerostomia. We used KK-A^y as the diabetes model and C57Bl/6J as the control. To assess salivary gland function, we measured carbachol (CCh) induced saliva from perfused submandibular gland, acinar and duct areas using Hematoxylin-Eosin staining, [Ca²⁺]_i increase in Fura-2 AM-loaded acinar cells. The amount of secreted saliva and the ion concentrations (Na⁺ and Cl⁻) were significantly less in KK-A^y. Salivary glucose was significantly greater in KK-A^y. KK-A^y duct cell volume increased, whereas acinar cell volume remained the same in KK-A^y and control. CCh induced [Ca²⁺]_i increase was significantly less in the KK-A^y in both extracellular Ca²⁺ containing and free conditions. On the other hand, Thapsigargin induced [Ca²⁺]_i increase was comparable in KK-A^y and control. These results demonstrate that submandibular salivation diminished in KK-A^y because of diminished Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum (ER) and it might be caused by hyperglycemia induces ER stress. Duct cell volume increased in the KK-A^y, possibly leading to increase of ion reabsorption and it result in a decreased concentrations of Na⁺ and Cl⁻ in saliva.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-54 下歯槽神経の再生過程における細胞接着分子の発現変化

○鈴木 達郎¹, 近藤 真啓², 菅野 直之¹, 岩田 幸一², 佐藤 秀一¹

¹日大 歯 保存 III

²日大 歯 生理

歯科治療時に起こる偶発事故の一つに口腔顔面領域の神経損傷が挙げられるが、損傷神経の再生機構についてはいまだ不明な点が多い。細胞接着分子 Cadherin は、神経の発生・発達の諸過程において重要な機能を持つ分子であり、シナプス形成および神経突起伸長に作用することから、損傷神経の再生に関与することが考えられる。そこで本研究では、下歯槽神経損傷モデルマウスを用いて、感覚機能の治癒過程における Cadherin の役割について検討を加えた。

下歯槽神経損傷モデルマウスを作製し、下唇部への機械刺激に対する痛覚閾値の変化をもとに神経再生過程を機能的に評価した。また、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および三叉神経節 (TG) における E-cadherin の発現変化を免疫組織化学的に解析した。

下歯槽神経切断により機械刺激に対する感覚鈍麻は、軸索切断 2 週間後には回復傾向を示したが、4 週間後でも対照群と同程度までは回復しなかった。Naïve 群において、E-cadherin は Vc の表層に存在し、非ペプチドニューロンマーカーである IB4 と共存した。一方、TG 内では、中型から大型ニューロンおよび一部の IB4 陽性ニューロンの細胞膜周囲に強い免疫活性を示した。下歯槽神経切断 2 週間後では、Naïve 群と比べて、Vc および TG の三叉神経第 3 枝の投射領域において E-cadherin の発現が有意に減少していた。

以上の結果より、神経損傷後、機械感覚の回復時期と一致して、三叉神経脊髄路核表層および TG ニューロンにおいて E-cadherin の発現が低下していることが明らかになった。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The expression of cell adhesion molecules advancing inferior alveolar nerve regeneration

○Suzuki T¹, Kondo M², Sugano N¹, Iwata K², Sato S¹

¹Dept Periodontol, Nihon Univ Sch Dent

²Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

In dental treatment, an accidental nerve injury in the orofacial area can create complications for patients and doctors, yet the molecular mechanism of nerve regeneration is largely unknown. Cadherin, which plays a critical role in axonal targeting and synapse formation, is thought to be candidates for nerve regeneration-related molecules.

In the present study, we evaluated functional regeneration of the injured axons measuring the reflex threshold value to mechanical stimulation of the lower lip and examined the expression patterns of E-cadherin in the trigeminal subnucleus caudalis (Vc) and trigeminal ganglion (TG) after inferior alveolar nerve transection (IANX) immunohistochemically.

After axotomy, the hypoalgesia to mechanical stimulation persisted until Day 7, and on Day 14 was recovered. However, until Day 28 of observation the mechanical threshold in IANX group was not recovered completely. E-cadherin immunoreactivities (IR) were observed in the IB4-positive layer of Vc and the pericellular membranes of some TG neurons. Fourteen days after IANX, the E-cadherin-IR were significantly decreased in Vc and TG.

Our results suggest that the change of E-cadherin expression levels may be involved in the functional regeneration of damaged TG neurons.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-55 ラットの睡眠時開口反射活性の術後性変化

○尾台-井出 令奈¹, 安達 一典², 渡部 茂¹, 坂上 宏²

¹明海大 歯 小児歯

²明海大 歯 薬理

【目的】近年、安静睡眠が炎症・神経因性疼痛・術後性疼痛などで障害されることが報告されたことから、それらの感覚変調は睡眠時の顎感覚運動システムの活性にも影響を与える可能性が示唆された。そこで、本研究では術後期間の違いが、安静覚醒時や安静睡眠時の開口反射活性に与える影響を検討した。**【方法】**Sprague-Dawley 雄性ラット（約 5.5 週齢）に、イソフルラン全身麻酔下で、心電図、筋電図（顎二腹筋前腹、咬筋）、脳波、眼電図採取ワイヤーを、加えてオトガイ舌筋には刺激用ワイヤーを埋入した。1 週間以上の回復期間を設け、その間観察環境への馴化を行った。術後 7 日（D7）、13 日（D13）、に実験を行った。安静覚醒（quiet awake : QW）時にオトガイ舌筋に電気刺激（200 μ s, 0.2 Hz, 5 回）を加え、顎二腹筋活動を 3/5 以上発現させる刺激強度を開口反射誘発閾値（TH）とし、5 分間隔で 3 回計測した。なお、刺激強度と開口反射応答性の相関を検討するために、TH の 1.5-2 倍の刺激を与え筋活動性の変化を検討した。続いて、安静睡眠時（quiet sleep : QS）とその後の安静覚醒（QWA）時の TH を求めた。脳波などの解析に併せて、睡眠潜時ならびに微小覚醒の発現回数も計測した。**【結果】**D7 では、QWB に比較して TH が QS 時に下降する群（下降群, n=4）と上昇する群（上昇群, n=3）に分けられた。しかしながら下降群は、D13 では QWB と比較して QS で TH の有意（ $P < 0.05$ ）な上昇を認めた。上昇群では、D13 でも D7 同様に TH の上昇を認めた。下降群、上昇群共に D7 と比較し D13 において睡眠潜時の短縮と微小覚醒発現の上昇を認めた。**【考察】**これらの結果より、術後性障害は睡眠障害のみならず顎口腔領域の感覚-運動連携にも影響を与え得ることが示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Alteration of the jaw-opening reflex excitability after surgery

○Odai-Ide R¹, Adachi K², Watanabe S¹, Sakagami H²

¹Div Pediatr Dent, Meikai Univ Sch Dent

²Div Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent

Recently, slow-wave sleep disturbance induced by injury was reported. The aim of this study was to determine if postoperative period associated with alteration of the jaw-opening reflex (JOR) excitability as well as sleep quality. Under general anaesthesia, 5.5-weeks-old male Sprague-Dawley rats (n=7) received wire implantation for recording EEG, EOG, EKG and EMG (anterior digastric and masseter muscles) and for electrical stimulation to genioglossus muscle. During recovery period, rats were habituated to the observation environment. JOR excitability was evaluated at post-operative days 7 (D7) and 13 (D13). Sleep-related electrophysiological features (e.g., EMG, EOG, EEG and EKG) were evaluated with sleep latency and micro-arousal. At D7, compared with JOR threshold (TH) during quiet awake before sleep (QWB), TH during quiet sleep (QS) was decreased in four animals (DOWN group) and increased in three animals (UP group). At D13, TH during QS was increased in DOWN group and the increased of TH during QS in UP group was preserved. Comparison with D7, reduction of sleep latency and increase of micro-arousal incidence were observed in both groups at D13. These findings suggest that it is essential to control for the effect of surgery on the outcomes of interest in sleep studies.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-56 矯正ワイヤー誘発新規口内炎モデルにおける疼痛発症メカニズム

○伊藤 美紗¹, 小野堅太郎¹, 人見 涼露¹, 野代 知孝¹, 郡司掛香織², 黒石加代子²,
川元 龍夫², 稲永 清敏¹

¹九歯大 歯 生理

²九歯大 歯 顎口腔機能矯正

多くの歯科矯正患者において、医原性に口内炎が発症することはよく知られている。口内炎による激しい疼痛は患者のQOL低下を引き起こすため、大きな問題となっている。口内炎疼痛に対する処置を行うためには、適切なモデル動物を用いた基礎研究によるメカニズムの解明が重要である。そこで我々は矯正ワイヤーを用いた口内炎発症ラットを新規に開発し、様々な薬物を用いて疼痛発生メカニズムについて検討した。実験には8週齢雄性Wistar系ラットを用いた。ペントバルビタール麻酔下にて、結紮線をろう着した長さ10mmの角ワイヤーを下顎切歯に装着し、角ワイヤー先端を粘膜に接触させ、翌日に撤去した。ワイヤー装着翌日に下口唇の腫脹と膿瘍を伴う潰瘍性口内炎が発症し、5日目までに完全に治癒した。自発痛の評価に自発ラビング時間を測定し、接触痛の評価には我々が最近開発した安定開口法を用いて機械逃避閾値を測定した。自発ラビング時間は装着翌日に有意に延長し、機械逃避閾値は装着翌日から3日目まで有意に低下しており、本モデルにおいて自発痛と接触痛が発症していた。抗菌薬前処置とシクロオキシゲナーゼ(COX)阻害薬インドメタシン前処置は本モデルにおける下口唇の腫脹を抑制した。しかしながら、抗菌薬前処置は自発痛と接触痛の発症を抑制せず、インドメタシン前処置は自発痛発症を抑制したが接触痛の発症は抑制しなかった。口内炎部では各種サイトカイン、COX-2およびプロスタグランジンの産生が増加していた。これらの結果より、矯正ワイヤーにより医原性に引き起こされる口内炎は、細菌感染というよりは組織傷害性の炎症により自発痛を発症し、接触痛発症は現在不明の経路により発症することが示唆された。歯科矯正治療中における口内炎疼痛の治療法開発が今後期待される。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Inadequate orthodontic wire-induced mucositis pain mechanism

○Ito M¹, Ono K¹, Hitomi S¹, Nodai T¹, Gunjigake K², Kuroishi K², Kawamoto T²,
Inenaga K¹

¹Div Physiol, Kyushu Dent Univ

²Div Orofac Funct Orthodont, Kyushu Dent Univ

Inadequate orthodontic appliances frequently cause oral mucosal lesions with severe pain. However, oral ulcer-induced pain following orthodontic appliances has not been studied. In this study, we developed a new rat pre-clinical model for orthodontic wire-induced oral ulcer pain and investigated pain mechanism in the model. Under pentobarbital anesthesia, 8 week-old Wistar rats were installed with a 10 mm-arched orthodontic thick wire between inferior incisors for a day. The sharp tip of the thick wire directly touched the labial region of the oral mucosa. Next day, severe oral ulcer and abscess were caused with severe inflation of the lower lip in the model rats. Spontaneous pain and mechanical allodynia were evaluated from spontaneous mouth rubbing time and head-withdrawal threshold to mechanical stimulation to the mucosal area, respectively, by using our proprietary methods. Spontaneous pain was induced on day 1 and mechanical allodynia was induced on days 1-3. Antibacterial pretreatment did not affect the spontaneous pain and mechanical allodynia inductions. Indomethacin pretreatment suppressed the spontaneous pain induction, but did not the mechanical allodynia induction. These results suggest that orthodontic wire-induced oral ulcer and abscess induces spontaneous pain due to injury-associated inflammation rather than infectious inflammation and mechanical allodynia due to unknown mechanism.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-57 ラット口内炎モデルに発症する口腔内疼痛に対するエンドセリン1の関与

○野代 知孝^{1,2}, 人見 涼露¹, 小野堅太郎¹, 伊藤 美紗¹, 正木 千尋², 細川 隆司², 稲永 清敏¹

¹九歯大 生理

²九歯大 口腔再建リハ

エンドセリンは様々な疼痛発症に関与していることが報告されている。しかし、口腔顔面領域における疼痛発症メカニズムへのエンドセリンの関与については不明な点が多い。本研究では、口内炎モデルラットに発症する口腔内疼痛に対する ET1 の関与を調べるために、行動学的手法および免疫組織化学的手法を用いて検討した。ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下にて 8 週齢雄性 Wistar ラットの下顎歯槽粘膜に 50% 酢酸を浸したろ紙を 30 秒間留置することで口内炎を惹起した。酢酸処理前および処理 1, 2 日後の口内炎部位を摘出後、切片を作製し、通法通りヘマトキシリン-エオジン染色と ET1 の免疫組織染色を行った。また、ELISA 法にて口内炎部位の ET1 のタンパク量を解析した。疼痛関連行動の評価として、酢酸処理前および処理後 2 日目において覚醒下にて自発ラビング時間 (自発痛の指標) を測定した。処理後 2 日目においては ET1 受容体の ET_A, ET_B アンタゴニストであるボセンタン (10 mg/ml/kg) および Vehicle (10% DMSO) を尾静脈投与した 1 時間後に自発ラビング時間と口内炎部へのカプサイシン (100 μM) 滴下に対するラビング時間 (カプサイシン誘発痛) を測定した。酢酸処理 2 日目において潰瘍を伴う口内炎が発症し、明らかな腫脹を認めた。また、潰瘍部位を中心に ET1 の発現が認められ、ET1 タンパク量はコントロールと比較して有意に増加していた。Vehicle 群では、自発ラビング時間の延長を認めたが、ボセンタン投与群では口内炎作製前と比較して有意な変化は認められなかった。また、カプサイシン滴下後のラビング時間は Vehicle 群と比較してボセンタン投与群は有意に短かった。以上の結果より、口内炎部位で増加した ET1 が自発痛およびカプサイシン誘発痛の発症に関与している可能性が示唆された。これらの結果は今後の口内炎疼痛の病態解明の一助となることが考えられる。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Involvement of endothelin-1 on oral ulcerative mucositis-induced pain in rats

○Nodai T^{1,2}, Hitomi S¹, Ono K¹, Ito M¹, Masaki C², Hosokawa R², Inenaga K¹

¹Div Physiol, Kyushu Dent Univ

²Div Oral Reconstr Rehabil, Kyushu Dent Univ

Although endothelins are known to be involved in pain, there are few reports to investigate the effect of endothelins on pain in orofacial region. In the present study, we examined whether endothelin-1 is involved in oral ulcerative mucositis (OUM)-induced pain. The OUM was induced by treatment with 50% acetic acid (AA) in the labial fornix region of the inferior incisors in rats. Hematoxylin and eosin staining and ET1-immunohistochemistry were performed in oral mucosal section. The expression level of endothelin-1 was evaluated by ELISA assay. Spontaneous rubbing time for 10 min and rubbing time for 3 min after capsaicin application to the mucosal region were measured in conscious condition. On day 2, bosentan (10 mg/kg), ET_A and ET_B antagonist, or vehicle (10% DMSO) were administered into the tail vein. Oral ulcer was obviously developed on day 2. Endothelin-1-immunoreactivity was observed around the ulceration and endothelin-1 level was significantly increased compared to naive. Furthermore, spontaneous and capsaicin-induced rubbing time were prolonged and those were inhibited by bosentan. These results suggest that OUM-induced endothelin-1 was involved in the induction of spontaneous and capsaicin-induced pain. The findings will contribute to understand the mechanism in the pathogenesis of OUM.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-58 2型糖尿病ラット唾液腺における副交感神経性血管拡張反応

○佐藤 寿哉, 石井 久淑

北医療大 歯 生理

糖尿病患者では唾液分泌減少による口腔乾燥症を伴うことが少なくない。唾液分泌には自律神経系が最も大きく関与していると考えられており、唾液腺におけるニューロパチーの進行と唾液分泌減少との関連が報告されている。是までに我々は唾液の水成分を供給する唾液腺血流動態に注目し、口腔顔面領域を支配する知覚神経の求心性電気刺激により唾液腺で誘発される副交感神経性血管拡張反応が血流動態の調節に重要であることを示唆する研究結果を報告してきた。糖尿病と唾液腺血流動態に関する先行研究では既に1型糖尿病のモデルであるストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを用いた研究結果が報告されている。しかし本邦の糖尿病患者で頻度の高い2型糖尿病のモデル動物を用いた検討はなされていない。本研究では肥満を伴う自然発症型の2型糖尿病ラット(OLETFラット)をウレタン麻酔し3大唾液腺の安静時血流と舌神経の求心性電気刺激(1-30 V, 1-30 Hz, 20 s)で誘発される副交感神経性血管拡張反応をレーザースペックルイメージング血流計を用いて記録した。糖尿病ラット唾液腺の安静時血流量はコントロールラットと比較して有意に低かった。舌神経刺激は唾液腺に刺激頻度と強度依存性の血管拡張反応を誘発させたが、耳下腺で誘発された血管拡張反応はコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に低かった。顎下腺と舌下腺の血管拡張反応には糖尿病ラットとコントロールラットの間で有意な差は認められなかった。我々の結果から2型糖尿病ラット唾液腺で認められた安静時血流量の低下と耳下腺における副交感神経性血管拡張反応の阻害が唾液分泌減少に重要であることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Parasympathetic vasodilation in major salivary glands in type 2 diabetic rats

○Sato T, Ishii H

Div Physiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Previously, we demonstrated that parasympathetic vasodilation in rat salivary glands was evoked by stimulation of orofacial sensory nerves, and noted the importance of hemodynamic regulation. Recent investigation has shown the hemodynamic disturbance in the submandibular glands of streptozotocin-diabetic rats, a model of type 1 diabetes mellitus (DM). However, the effects of hyperglycemia in type 2 DM on hemodynamic regulation of salivary glands are poorly understood. In the present study, we analyzed the hemodynamics in the major salivary glands during rest and electrical stimulation of the central cut end of the lingual nerve in urethane-anesthetized spontaneously-developed type 2 diabetic rats. The glandular resting blood flow of diabetic rats was significantly lower than that of nondiabetic rats. Lingual nerve stimulation induced intensity- and frequency- dependent blood flow increases in three glands in both diabetic and nondiabetic rats. The magnitude of the changes in vascular conductance in the parotid gland of diabetic rats was significantly lower than that of nondiabetic rats, but this was not the case in the submandibular and sublingual glands. Our results suggest that decreased glandular resting blood flow and inhibition of parasympathetic vasodilation in the parotid gland may play an important role in xerostomia.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-59 下歯槽神経損傷後の異所性疼痛に対するマクロファージの関与

○Dulguun Batbold¹, 篠田 雅路¹, 山口 聡², 岩田 幸一¹

¹日大 歯 生理

²医科歯科大 院医歯

The role of macrophages in ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury

○Batbold D¹, Shinoda M¹, Yamaguchi S², Iwata K¹

¹Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

²Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Purpose: Accidental mandibular nerve injury which occasionally occurs during molar teeth extraction or dental implant procedure frequently induces ectopic pain in the orofacial region. However, the exact mechanism of the ectopic orofacial pain is still not known. Therefore, we investigated the possible ectopic orofacial pain mechanism that interacts with immune cells in trigeminal ganglion (TG) following inferior alveolar nerve transection (IANX). **Materials & Methods:** We performed IANX under deep anesthesia in Sprague-Dawley rats (Male, 160-270g). Mechanical head-withdrawal threshold (MHWT) in the whisker pad skin ipsilateral to IANX was measured every other day for 13 days using von Frey filament. We examined Iba1 expression in TG to analyze the infiltration of macrophage in TG on day 3 after IANX, immunohistochemically. To examine the effect of macrophage infiltration in TG on ectopic orofacial pain, we measured the MHWT in the whisker pad skin ipsilateral to IANX with the successive intrathecal administration of macrophage depletion agent, liposomal clodronate clophosome-A (LCCA). Moreover, we examined TNF- α expression in TG on day 3 in IANX, IANX with LCCA, IANX with the vehicle, and sham groups. **Results & Conclusion:** MHWT in the whisker pad skin was significantly reduced, and the number of Iba1 immunoreactive (IR) cells in TG was significantly increased on day 3 after IANX. The successive intrathecal administration of LCCA greatly reduced the number of Iba1-IR cells in 1st/2nd branches of the trigeminal nerve region (V1/V2) in TG, and also recovered the reduced MHWT in the whisker pad skin. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression in TG was enhanced on day 3 after IANX, which is depressed by intrathecal administration of LCCA. These findings suggest that the infiltration of macrophages, which induce TNF- α in V1/V2 in TG was proliferated following IANX, resulting ectopic mechanical allodynia in whisker pad skin.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-60 Polphyromonas gingivalis 由来 LPS が心筋, 骨格筋に及ぼす影響

○川村 直矢¹, 大貫 芳樹², 奥村 敏², 五味 一博¹, 氏家 優子¹, 梅木 大輔³,
伊藤 愛子³

¹鶴大 歯 歯周病

²鶴大 歯 生理

³鶴大 歯 矯正

【目的】歯周病と全身疾患の関連性については近年注目されているが、そのメカニズムの解明は不十分である。本研究では、歯周病が全身の筋肉に及ぼす影響について検討した。【方法】雄マウス (C57BL6/J, 8 週齢) を用いて PBS 投与群 (Control) と Porphyromonas gingivalis 由来の lipopolysaccharide 投与群 (PG-LPS; 4 mg/kg/day : 腹腔内投与) を作成した。4 週後, 心筋(CA), 咬筋(MA), 前脛骨筋(TA), ヒラメ筋(SOL)を摘出し, 筋重量/前脛骨長比(tibia; mg/mm) ならびに筋線維断面積(CSA; μm^2) を測定した。【結果】PG-LPS 群では Control 群に比較して MA/tibia (7.7 ± 0.29 (Control) vs 6.3 ± 0.3 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.01$) ならびに TA/tibia (3.5 ± 0.08 (Control) vs 3.2 ± 0.09 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.05$) は有意に減少したが, CA/tibia (6.7 ± 0.35 (Control) vs 8.7 ± 0.49 (PG-LPS), $n=3-6$, $P < 0.05$) は有意に増加した。なお SOL/tibia は両群間に有意差はなかった。以上の結果は CSA 測定結果でも同様の傾向を示し, MA (1693 ± 65 (Control) vs 1470 ± 59 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.01$) ならびに TA (1711 ± 42 (Control) vs 1536 ± 47 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.05$) の PG-LPS 群では減少傾向を示したが, SOL では両群間に有意差はなかった。【結論】PG-LPS の慢性投与は, マウスの心肥大と骨格筋(咬筋, 前脛骨筋)の委縮を誘導した。以上の結果は, 歯周病治療が心疾患, 咀嚼機能障害, 下肢筋力低下を予防して高齢者の健康寿命延伸に寄与する可能性を示唆している。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of LPS generated from Porphyromonas gingivalis on muscle mass in the whole body

○Kawamura N¹, Ohnuki Y², Okumura S², Gomi K¹, Ujiie Y¹, Umeki D³, Ito A³

¹Dept Periodontol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Periodontal disease might play an important role for the development of systemic disease but the mechanisms remains poorly understood. We thus examined the effect of periodontal disease on the muscle mass within the whole body. Male mice (C57BL6/J, 8-week-old) were treated with Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide (PG-LPS) (20ug/mouse/day ip) for 4 weeks. Control mice received an identical volume of saline only. After 4 weeks, we examined muscle mass to tibial length ratio (mg /mm) and muscle fiber cross sectional area (CSA; μm^2) of masseter (MA), tibialis anterior (TA), soleus (SOL) and cardiac muscle (CA). MA /tibia and TA/tibia were significantly decreased by the treatment of PG-LPS from baseline (MA/tibia: 7.7 ± 0.29 (Control) vs 6.3 ± 0.3 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.01$; TA/tibia 3.5 ± 0.08 (Control) vs 3.2 ± 0.09 (PG-LPS), $n=5$, $P < 0.05$). Conversely, CA/tibia was significantly increased from baseline (6.7 ± 0.35 (Control) vs 8.7 ± 0.49 (PG-LPS), $n=3-6$, $P < 0.05$) However, SOL/tibia was not altered by the treatment of PG-LPS. We also confirmed the above data by the measurement of CSA. These data indicate that PG-LPS treatment might exert atrophic effects on MA and TA but it might exert hypertrophic effect on CA, suggesting that it might contribute to the favorable effects on health expectancy in elderly persons.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-61 味神経切断が塩酸キニーネに対する忌避行動に及ぼす影響

○大木 誠, 三浦 裕仁, 齋藤 充

鹿大 院医歯 口腔生理

一般的に苦味物質は動物にとって有害であり, したがって苦味の主な機能は有害物質の摂取による中毒を回避することにあると考えられている. α -gustducin は哺乳類における苦味の情報伝達に関与している G タンパク質サブユニットの一つである. 我々の先行研究 (友成ら, 2009), α -gustducin ノックアウト (GKO) マウスでは野生型マウスに比べ, 塩酸キニーネに対する大錐体神経の応答は有意に低下するが, 鼓索神経の応答には有意な差がみられなかった. このことから, キニーネに対する大錐体神経応答および鼓索神経応答はそれぞれ α -gustducin 依存적および非依存的信息伝達経路を介していることが示唆された. そこで, 苦味物質に対する忌避行動における α -gustducin 依存적および非依存적応答間の役割の違いを明らかにするために, 鼓索神経あるいは大錐体神経の切断が塩酸キニーネに対する忌避行動に及ぼす影響を licking 法によって評価・解析した. その結果, 大錐体神経を切断すると野生型マウスと GKO マウスの双方で忌避行動が減少したが, 鼓索神経を切断しても忌避行動に有意な変化は認められなかった. この結果から, 塩酸キニーネに対する忌避行動は大錐体神経が伝える感覚情報によって生じており, 鼓索神経が伝える情報の寄与は有意でないことが明らかとなった. 大錐体神経と鼓索神経では伝えている苦味情報の質が異なり, 鼓索神経の支配領域には α -gustducin 非依存적な未知の苦味物質受容・情報伝達機構が存在することが示唆された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Effects of gustatory nerve transection on the licking behavior to quinine-HCl

○Ooki M, Miura H, Saito M

Dept Oral Physiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Bitter substances are generally harmful to animals, and therefore it is believed that the main function of bitter taste is to avoid intoxication by the ingestion of poisonous substances. α -Gustducin is one of the G-protein subunits involved in the transduction of bitter taste in mammals. We previously reported that there were no significant differences in neural response of the chorda tympani nerves (CT) to quinine-HCl (QHCl) between α -gustducin knockout (GKO) and wild-type (WT) mice, while the neural response of the greater superficial petrosal nerves (GSP) to these compounds was markedly reduced in the GKO mice (Tomonari et al., 2009). This observation clearly suggests that α -gustducin-independent and -dependent signaling pathways mediates the CT and GSP responses to QHCl, respectively. To clarify the difference in roles in the taste-aversion behavior between the α -gustducin-dependent and -independent responses to bitter compounds, we examined the effects of gustatory nerve transection (CT or GSP) on the licking behavior to QHCl. The transection of the GSP significantly reduced the aversion to QHCl in both the GKO and the WT mice, while the transection of the CT did not significantly affect the aversion. This result shows that the aversive effect of QHCl is mainly mediated by the GSP.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-62 気圧計の口腔機能計測への応用

○平木 圭佑¹, 山田 好秋², 杉山 哲也¹, 石田 瞭¹

¹東歯大 院歯 健康科学

²東歯大 口科研

【目的】安静時の下顎の姿勢保持に関わる要因として口蓋と舌の間に発生する空間（以下 STP とする）に生じる陰圧が関係することが知られている。これまでに STP の内圧測定を試みた研究は存在するが、いずれも正確な計測は難しい機構のため新しい圧計測法による追試の必要性が指摘されている。そこで我々は小型の気圧計を使用した新しい圧計測法を開発し、STP の内圧を計測した。【方法】健康成人 14 名に対して気圧計を正中の硬口蓋後方に貼付し、座位にて計測を施行した。次の 3 つの状態を連続して計測する。(1)大気圧の記録：計測開始時に口唇を開放させ、大気圧を記録した。(2)安静時の内圧記録：口唇閉鎖を指示し、内圧を記録した。(3)嚥下後の内圧記録：空嚥下を指示し、嚥下後の内圧を記録した。1 被験者につき 5 回施行し、被験者ごとに嚥下前・嚥下後の内圧と大気圧との差の平均値を求めた。また追加実験として、センサを舌下と口腔前庭を含む空間（以下 SOV とする）に設置し、STP と同時に内圧計測を行った。2 つのセンサそれぞれで被験者ごとに嚥下前・嚥下後の気圧と大気圧との差の平均値を求めた後に、センサ間の比較を行った。【結果および考察】STP の内圧は嚥下前・嚥下後にかかわらずほとんどの被験者で陰圧を示した。14 名の平均気圧は嚥下前が -0.17 ± 0.24 kPa, 嚥下後が -0.51 ± 0.59 kPa となり、統計学的に有意な差を認めた ($p < 0.05$)。また、追加実験により STP と SOV の 2 つの空間は独立していることが示唆された。以上の結果から安静時に舌背と口蓋間に生じる空間には陰圧が存在することが確かめられた。口腔内の気圧分布の違いにより口腔内での舌位を安定させることに働いていると考えられる。また、舌位を安定させることで下顎の姿勢保持に対して部分的に寄与していることが示唆される。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

An application of barometer for assessment of oral functions

○Hiraki K¹, Yamada Y², Sugiyama T¹, Ishida R¹

¹Dept Oral Health Clin Sci, Tokyo Dent Coll

²Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll

Negative pressure generated in a space between palate and tongue (STP) may be a candidate as a factor to determine the position of lower jaw at rest, as has been described by Donders. We have developed a system, which can measure absolute pressure in a small space. Sensor was placed on the posterior midline of the hard palate. Measurements were repeated five times over three sessions for each of fourteen subjects as follows; (1) atmospheric pressure: the subjects opened their mouth; (2) closed condition: they closed their jaw and lips; (3) tongue repositioning condition; after they swallowed saliva. In the closed condition, the pressure slightly decreased as -0.17 ± 0.24 (mean \pm SD) kPa compared to atmospheric pressure. After swallowing, pressure was measured as -0.50 ± 0.61 kPa. The values were statistically significant ($P < 0.05$). Additional sensor was set in the oral vestibule under tongue (SOV) and the pressure changes in STP and SOV were compared. Two spaces were found to be independent each other. We suggested that the negative pressure in this space would be enough to keep the tongue in the palatal fossa, and that it may contribute to maintain the rest position by stabilizing the tongue.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-63 下歯槽神経切除後の顔面皮膚感覚機能回復に対する GDNF の有用性○渡辺 雅弘¹, 篠田 雅路², 菅野 直之¹, 佐藤 秀一¹, 岩田 幸一²¹日大 歯 保存 III²日大 歯 生理

下歯槽神経損傷によるオトガイ部皮膚の感覚鈍麻は、歯科臨床において高頻度に起こる偶発症の一つであり、治療に苦渋することが多い。グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)は軸索伸長を促進することが知られており、下歯槽神経損傷後の軸索再生に有効である可能性がある。今回われわれは下歯槽神経切除モデルを作製し、切除部位への GDNF 局所投与による下歯槽神経支配領域皮膚における機械痛覚の経時的变化および下歯槽神経の組織学的変化を解析した。全身麻酔下にて SD ラット(7w, ♂)の下歯槽神経(IAN)を約 2 mm 切除し、IAN 切除ラットを作製した。IAN 切除部位に GDNF (1.25 μM) または Vehicle (0.1M PBS) を含浸した徐放担体を埋入し、4-0 ナイロン糸にて皮膚縫合した。機械刺激装置 (Digital fon Frey) を使用し、下歯槽神経支配領域(オトガイ部皮膚)への機械刺激に対する逃避閾値(MHWT)を経日的に計測した。さらに、IAN 切除部位に GDNF を含浸した徐放担体を埋入したのち、GDNF 受容体(GFR-α1)中和抗体を連日局所投与し、同様に MHWT を経日的に計測した。IAN 切除後 3, 5 日目に IAN 切除部位を摘出し、シュワン細胞のマーカーである Glial Fibrillary Acidic Protein(GFAP)および GFR-α1 発現を免疫組織学的手法にて検索した。IAN 切除後 5 日目、切除部位への GDNF 投与により MHWT が有意に回復した。また、GFR-α1 中和抗体を連日局所投与により、その MHWT の回復が有意に抑制された。IAN 切除部位において、GFAP および GFR-α1 共陽性細胞を認めた。以上の結果から、IAN 切除部位への GDNF 投与はオトガイ部皮膚の感覚機能回復を促進することが示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。**Effect of local GDNF administration on functional recovery of facial sensation following inferior alveolar nerve transection**○Watanabe M¹, Shinoda M², Sugano N¹, Satou S¹, Iwata K²¹Dept Periodontol, Nihon Univ Sch Dent²Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

Clinically, mandibular nerve injury causes anesthesia or hypesthesia in the labiomental skin. Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) is known to promote axonal outgrowth, suggesting that GDNF administration accelerates functional recovery following nerve injury. The present study was undertaken to determine the role of GDNF in the site of nerve injury on mechanical anesthesia or hypesthesia in the labiomental skin following inferior alveolar nerve transection (IANX). The inferior alveolar nerve was transected under deep anesthesia, and GDNF (1.25 μM) was continuously administrated to the site of nerve injury using biodegradable hydrogel. We measured daily mechanical head-withdrawal threshold (MHWT) in the labiomental skin. By the same token, MHWT was measured in GDNF-administrated IANX group with GDNF receptor (GFRα1) neutralizing antibody. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP; a marker of Schwann cell) and GFRα1 expression in the site of nerve injury were also examined immunohistochemically. Local GDNF administration significantly accelerates the recovery of increased MWRT, and the recovery was significantly depressed by GFRα1 neutralizing antibody administration to the injury site. GFAP and GFRα1 immunoreactive cells were observed in the wound site. Taken together, these findings suggest that GDNF administration to the wound site is helpful in functional recovery of labiomental sensation following IANX.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-64 Cbfb1 と Cbfb2 アイソフォームは骨格形成過程において重要な役割を果たす

○姜 晴, 秦 昕, 小守 寿人, 松尾 友紀, 宮崎 敏博, 森石 武史,
小守 壽文

長大 院医歯薬 細胞生物

Cbfb1 and Cbfb2 isoforms play important roles in skeletal development

○Jiang Q, Qin X, Komori H, Matsuo Y, Miyazaki T, Moriishi T, Komori T

Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Core-binding factor β (Cbfb) forms a heterodimer with Runx family transcription factors (Runx1, Runx2, and Runx3), and enhances their DNA binding capacity. Cbfb is known to be related with inversion of chromosome 16 and acute myeloid leukemia in humans, and essential for fetal liver hematopoiesis. We recently reported that Cbfb stabilizes Runx family proteins and required for chondrocyte differentiation and proliferation and osteoblast differentiation by generating Cbfb conditional knockout mice. Cbfb has two functional isoforms, Cbfb1 and Cbfb2, which are formed by alternative splicing in Exon5. To investigate functions of Cbfb isoforms, we mutated splicing donor site and generated Cbfb1 knockout mouse (Cbfb1^{-/-}) and Cbfb2 knockout mouse (Cbfb2^{-/-}). Skeletal development was delayed in Cbfb2^{-/-} embryos but not in Cbfb1^{-/-} embryos. However, Cbfb1 was more potent than Cbfb2 in the enhancement of DNA binding of Runx2. Cbfb2 mRNA was upregulated in Cbfb1^{-/-} embryos, whereas Cbfb1 mRNA was not upregulated in Cbfb2^{-/-} embryos, and the absolute numbers of Cbfb2 mRNA in wild-type embryos were three times higher than those of Cbfb1. These findings indicate that Cbfb1 is more potent than Cbfb2, but Cbfb2 plays major roles in skeletal development by its abundance due to the strictly restricted splicing for Cbfb1 isoform.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-65 Runx シグナリングは一次口蓋と二次口蓋の融合に Tgfb3 を介して関与している

○Sarper Safiye, 黒坂 寛, 三原 聖美, 青山 剛三, 山城 隆
阪大 院歯 矯正

Runx signaling is specifically involved in the fusion between the primary palate and the secondary palate by regulating Tgfb3 signaling

○Sarper S, Kurosaka H, Mihara K, Aoyama G, Yamashiro T
Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

The mammalian palate is formed from the primary and the secondary palate and the failure in fusion at this boundary causes anteriorly-limited cleft palate. It is known that palatal fusion is regulated in different manner in the anterior-posterior axis, however, it should be still addressed more how the primary palate fuses with secondary palate. *Runx1* is a member of the *Runx* family genes, which is known to be a master transcription factor for hematopoietic development. Recent studies demonstrated that *Runx* signaling is also associated with morphogenesis of various developing organs. We previously showed that *Runx1* is specifically expressed at the fusing epithelium during palatogenesis and *Runx1* deficiency results in incomplete clefting only at the anterior junction between the primary and the secondary palate, but not in the junction between the palatal process in the secondary palates. **Purpose:**In this study we investigated the mechanisms of *Runx1*-associated palatal fusion including molecular network using epithelial specific *Runx1* knock out mice. **Materials & Methods:**We generated epithelial specific knock out mouse using Cre-loxp (K14 Cre *Runx1*^{fl/fl}) system. Whole mount *in situ* hybridization method is used for examine anterior palate specific genes. In order to quantify gene expression difference we use laser microdissection system on E15 palate. We use TGFB3 soaked beads to rescue palate of K14 Cre *Runx1*^{fl/fl} mouse. **Results & Conclusion:**Similar to our previous report, K14Cre;*Runx1*^{fl/fl} mice exhibited anteriorly-limited cleft palate which suggests region specific association of *Runx1* during palatal fusion. Interestingly, *Tgfb3* which plays critical roles during palatal fusion showed significant downregulation only in the primary palate, but not in the secondary palate. Such temporospatial downregulation of *Tgfb3* also accompanied the downregulation of *Mmp-13* and *Fgf9*. In addition, reintroduced TGFB3 rescued the defects in the fusion of the mutant palate in the culture. These results suggest epithelial *Runx1* during palatogenesis regulates expression of *Tgfb3* in a region specific manner that is governing anterior palatal fusion.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-66 歯のエナメル上皮における RUNX1 と CFBF は、マウスのエナメル質形成のために重要です

○Sarper Safiye¹, 三浦 治郎², 山口 哲³, 今里 聡³, 森田 知里¹, 山城 隆¹

¹阪大 院歯 矯正

²阪大 総診

³阪大 院歯 理工

Runx1 and Cbfb in dental enamel epithelium is important for enamel formation in mouse

○Sarper S¹, Miura J², Yamaguchi S³, Imasato S³, Morita C¹, Yamashiro T¹

¹Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Div Interdisci Dent, Osaka Univ Dent Hosp

³Dept Biomater Sci, Osaka Univ Grad Sch Dent

Enamel is one of the main tissue for making up the tooth and has the hardest combination in human body. Many genes are involved in enamel formation. If enamel formation altered human disease named enamel hypoplasia may occur. We have already discovered that epithelial elimination of one of transcription factor *Cbfb* which is one of the co-factor of *Runx* gene family result in enamel hypoplasia in mice incisor. It has been known that *Runx1* and *Cbfb* expression was observed only at dental epithelium. In this study we focused on the role of *Runx1* and *Cbfb* on molar enamel formation. We hypothesize that *Runx1* and *Cbfb* deficiency in dental epithelium results in enamel hypoplasia of mouse molar. **Purpose:** In order to investigate how *Runx1* and *Cbfb* in the dental epithelium effects enamel formation and ameloblast differentiation. **Materials & Methods:** We generated epithelial specific knock out mouse using Cre-loxp (K14 Cre *Runx1*^{fl/fl} and K14 Cre *Cbfb*^{fl/fl}) system. We used micro-CT to see morphological defect. Mineralized tissue was examined through Scanning electron microscope and Vickers hardness test. In order to reveal histological defect of K14 Cre *Runx1*^{fl/fl} (*Runx1* cKo) and K14 Cre *Cbfb*^{fl/fl} (*Cbfb* cKo) mice we performed hematoxylin-eosin staining on sections from dissected maxilla and mandibule. For observing detailed enamel prism structure, electron micrographs was used to analyze from the surface of epoxy resin embedded tooth of adult mice. We used laser microdissection system to disclose genes that have interaction with *Runx1*-*Cbfb* system. **Results & Conclusion:** From gross morphological analysis of incisor teeth we revealed abrasion at cusps of *Runx1* cKo and *Cbfb* cKo mouse molars. Electron micrographs also showed that increased abrasion on occlusal surface of molars and increased organic material in *Runx1* cKo and *Cbfb* cKo mice than control mice. Additionally enamel prism structure is obviously disturbed in *Runx1* cKo as well as *Cbfb* cKo mice. Moreover histological analysis uncovered that *Runx1* cKo and *Cbfb* cKo mice have retarded enamel formation and marked defect of ameloblast differentiation. As the result of PCR of laser microdissected tissue, we reveal that expression of enamel specific genes significantly decreased at dental epithelium of cKo molar. Taken together *Runx1* and *Cbfb* in dental epithelium is critical for ameloblast differentiation and enamel formation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-67 Asporin は咬合機能低下に伴う新生歯槽骨添加を制御する

○糸日谷佳菜子¹, 菅崎 弘幸¹, 石川美佐緒², 下田 信治², 中村 芳樹¹

¹鶴大 歯 矯正

²鶴大 歯 解剖 I

【目的】咬合機能低下により歯根膜の廃用性萎縮変化が生じ、それに伴い歯槽骨表層に新生骨が添加されるが、その制御機構は不明である。骨新生には TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達が関与している。歯根膜にはそのシグナル伝達を競合的に阻害する分子 Asporin が発現し、恒常性維持に役割を果たすことが示唆されている。しかし、咬合機能低下時の Asporin 発現と歯槽骨新生との関連について報告はない。本研究では、咬合機能低下に伴い Asporin 発現が低下し、それにより TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達が増強され、歯槽骨新生が生じると仮説を立て、その検証を行うことを目的とする。【試料と方法】咬合機能低下モデルとして、12 週齢 Wistar 系雄性ラットの下顎右側第一臼歯歯冠を除去し、上顎第一臼歯について組織学的に検討した。右側上顎骨を実験群、左側を対照群とした。カルセイン、キシレノールオレンジを用いて骨標識を行い、対合歯除去後 14 日目の上顎骨の非脱灰凍結切片より骨形成を観察した。対合歯除去後 1, 3, 7 日目の上顎骨の非脱灰凍結切片より、Laser capture microdissection にて歯根膜組織を採取し、real-time PCR にて *Asporin*, TGF- β シグナル伝達分子の *Smad3*, 骨分化マーカーの *Osteocalcin* の発現を解析した。対合歯除去後 1, 3, 7, 14 日目の上顎骨のパラフィン切片を作製し、免疫染色にて Asporin, p-Smad3, Osteocalcin のタンパク発現を観察した。【結果】実験群 14 日で新生歯槽骨の形成が亢進した。実験群 1, 3, 7 日で *Asporin* 遺伝子発現が減少し、3, 7 日ではタンパクレベルで発現が低下した。実験群 7 日で *Smad3*, *Osteocalcin* 遺伝子発現及び、p-Smad3, Osteocalcin タンパク発現の増加を認めた。【考察】咬合力負荷がなくなることで歯根膜における Asporin 発現が低下し、それにより TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達が増強され、新生歯槽骨の形成が促進されることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Asporin regulates occlusal hypofunction-mediated alveolar bone apposition

○Itohiya K¹, Kanzaki H¹, Ishikawa M², Shimoda S², Nakamura Y¹

¹Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Oral Anat, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Objective: Occlusal hypofunction causes narrowness of periodontal ligament (PDL) by alveolar bone apposition. However, the mechanisms remain unclear. Asporin, which binds and modulates TGF- β signaling, is expressed in PDL and is thought to be main regulator of alveolar bone homeostasis. Therefore, we hypothesized that Asporin is down-regulated by occlusal hypofunction, which resulted in the increased alveolar bone apposition via upregulation of TGF- β signaling. **Methods:** Crowns of lower right first molars were removed in Wistar rats (12-wk old) to induce occlusal hypofunction. Right upper jaws were used as experimental groups, and the left were used as control. Undecalcified-frozen sections were prepared and PDL tissue specimens were excised using LMD-technique. Gene expressions of Asporin Smad3 and Osteocalcin were examined by reverse-transcribed qPCR. Paraffine sections were also prepared for immunohistological examination for Asporin, p-Smad3 and Osteocalcin. **Result:** The distances between the Calcein/Xylenol-orange labelings were increased after 14-days of hypofunction. Gene and protein levels of Asporin were down-regulated after 1,3,7-days of hypofunction. Smad3 and Osteocalcin were upregulated after 7-days of hypofunction. **Conclusion:** Asporin is down-regulated by occlusal hypofunction, which resulted in the increase of alveolar bone apposition via upregulation of the TGF- β signaling. **Conflict of Interest:** The authors declare no competing interests.

P1-68 歯の矯正学的移動における歯槽骨リモデリング制御機構の解析

○庄司あゆみ^{1,2}, 小野 岳人¹, 森山 啓司², 中島 友紀^{1,3,4}

¹医科歯科大 院医歯 分子情報伝達

²医科歯科大 院医歯 顎顔面矯正

³科学技術振興機構 さきがけ

⁴日本医療研究開発機構 革新的先端研究開発支援事業

矯正力に伴う歯の移動は、圧迫側と牽引側における歯槽骨のリモデリングによって起こる。特に圧迫側での歯槽骨吸収には破骨細胞が必須であることから、矯正力による破骨細胞分化促進因子(RANKL)の発現誘導が歯の移動の鍵となると考えられている。生体においては、骨芽細胞、骨細胞など様々な細胞がRANKLを発現し、破骨細胞分化を支持していることが明らかになっている。しかし、矯正力負荷に応答してRANKLを産生し、破骨細胞による骨吸収とそれに伴う歯の移動を制御する主要な細胞とその分子機構については、いまだ十分には解明されていない。本研究では、マウスの上顎大白歯をコイルスプリングにより牽引するモデルを用いて、歯の移動における骨吸収の誘導機構を解析した。野生型マウスの歯周組織の構成細胞を分画し、RANKLの発現を解析したところ、骨芽細胞や歯根膜細胞と比較して骨細胞で有意に高いことが見出された。骨細胞の発現するRANKLの重要性を生体レベルで明らかにするため、骨細胞特異的RANKL欠損マウスを作出し、歯の移動量の評価と組織学的解析を行った。このマウスでは、野生型マウスと比較して、移動量が有意に低下し、圧迫側におけるTRAP陽性細胞数が減少していた。以上の結果から、矯正力に伴う骨吸収において、骨細胞が、歯槽骨のリモデリングを制御するRANKLの主要な発現細胞であることが明らかになった。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

RANKL expressed by osteocytes has a key role for osteoclastogenesis during orthodontic tooth movement

○Shoji A^{1,2}, Ono T¹, Moriyama K², Nakashima T^{1,3,4}

¹Div Cell Signal, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Div Maxillofac Orthognathics, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

³Precursory Res for Embryonic Sci Technol (PRESTO), Japan Science and Technology Agency (JST)

⁴Japan Agency for Medical Research and Development, Core Research for Evolutional Science and Technology (AMED-CREST)

Orthodontic tooth movement is achieved by the alveolar bone remodeling taking place in the compression side and tension side, and osteoclastic bone resorption is a key event to trigger the process especially in the compression side. RANKL is an essential factor for osteoclastogenesis, however, it has not been well determined which cell type in the periodontal tissue predominantly expresses RANKL during tooth movement in response to orthodontic force application. To investigate how osteoclastic bone resorption is regulated during the orthodontic tooth movement, we applied orthodontic force on the maxillary first molar of the mice by a closed-coil spring. The expression of RANKL in osteocytes was much higher than in osteoblasts and periodontal ligament cells isolated from the periodontal tissues. We hypothesized that osteocytes would be the major source of RANKL during orthodontic tooth movement, and analyzed the genetically-modified mice in which RANKL is conditionally deleted in osteocytes. The orthodontic tooth movement and the number of TRAP positive cells at the compression side were less in these mice than in the wild-type mice. Thus, it is demonstrated that there is a crucial role for osteocytes as the major source of RANKL during orthodontic tooth movement.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-69 レチノイン酸シグナルと Shh シグナルの相互作用が顔面形成に及ぼす役割

○Wang Qi, 山城 隆, 黒坂 寛
阪大 院歯 矯正

Retinoic acid affects craniofacial patterning by regulating sonic hedgehog signaling

○Wang Qi, Yamashiro T, Kurosaka H

Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

Purpose: Excessive intake of retinoic acid (RA) or its precursor, vitamin A, during early pregnancy is associated with increased incidence of craniofacial defects in offspring. However, the pathogenetic mechanism of abnormal craniofacial development caused by excess RA is not fully understood. The aim of the present study is to investigate the effects of excess RA on early craniofacial development in mouse fetuses and analyze the teratogenic mechanism. **Materials & Methods:** We gave all-trans RA (25 mg/kg body weight) to ICR pregnant mice by gastric intubation at embryonic day 8.5, 9.5 and 10.5, and harvested embryos at E11.5. **Results & Conclusions:** It was found that mice with maternal retinoic acid treatment exhibit abnormal craniofacial development including cleft palate, anomalies in the basisphenoid and basioccipital bones, Syngnathia, Micrognathia, ect. Moreover, we discovered that expression of Sonic hedgehog (Shh), and its downstream genes Ptch1 and Gli 1 were reduced around palatal region and the pituitary fossa of RA-treated embryos. Furthermore, the incidence of cleft palate and anomalies in the basisphenoid and basioccipital bones due to overdose RA was reduced by administration of SAG (Shh signaling agonist). Thus, our results suggest that one of the pathogenesis of cleft palate and anomalies in the basisphenoid and basioccipital bones after excessive RA exposure is likely to be associated with the downregulation of Shh signaling pathway.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-70 病的に活性化された破骨細胞：形成条件の検討と蛍光プローブを用いた骨吸収イメージング

○白鳥 卓麻^{1,3}, 久木田明子², 上原 範久¹, 久本由香里¹, 張 旌旗¹, 山座 孝義¹,
古谷野 潔³, 久木田敏夫¹

¹九大 院歯 分子口腔解剖

²佐賀大 医 微生物

³九大 院歯 インプラント

【目的】正常破骨細胞ではほぼ検出されない CSF-1 受容体が病的骨破壊をおこす破骨細胞では高発現すること、関節炎マウスでは膜抗原 Ly6C を発現する前駆細胞が病的骨破壊をおこす破骨細胞に分化することが報告されており、病的骨破壊をおこす破骨細胞は正常な破骨細胞とは異なるポピュレーションを形成している可能性がある。病的環境下に形成された破骨細胞に特異的または選択的に発現する分子を特定出来れば、病的な骨破壊を起こす破骨細胞のみを制御することが可能になる。今回、病的に活性化された破骨細胞を誘導する条件を検討するとともに、蛍光プローブを用いた骨吸収イメージングを行った。更に正常な破骨細胞の機能発現に必須なインテグリン活性化分子 Kindlin-3 の病的骨破壊への関与についても検討した。【方法】各種炎症性サイトカインをマウス骨髄細胞を用いた破骨細胞分化系に添加、培養後、象牙質片に再播種し同一条件下で骨吸収させた。SEM による解析とともに酸感受性蛍光プローブを用いた骨吸収イメージングと定量化を行った。ウエスタンブロッティングにより Kindlin-3 の発現を検討した。【結果】IL-1 β 存在下で形成された破骨細胞が顕著に高い骨吸収活性を有することがわかった。更に、酸感受性蛍光プローブを吸着させた象牙質片を用いて活性化のイメージング解析を行った。酸感受性蛍光プローブを用いた骨吸収イメージング解析により IL-1 β 存在下で形成された破骨細胞は無刺激の破骨細胞に比べ明らかに多量のプロトン (H⁺) を象牙質片表面に向けて遊離することがわかった。IL-1 β 添加による Kindlin-3 の顕著な発現低下を認めた。【結論&考察】IL-1 β 存在下で形成された破骨細胞に顕著な機能亢進を認めた。正常な破骨細胞とは異なるポピュレーション、すなわち「病的活性化破骨細胞」である可能性が強く示唆された。(非会員共同研究研究者:東大 薬 薬品代謝化学/医 生体情報分野 浦野泰照, 神谷真子, 国府田絹子)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Are osteoclasts induced in the presence of inflammatory cytokines related to the pathologically activated osteoclasts ?

○Shiratori T^{1,3}, Kukita A², Uehara N¹, Kyumoto Y¹, Zhang JQ¹, Yamaza T¹, Koyano K³,
Kukita T¹

¹Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Div Microbiol, Fac Med Saga Univ

³Sect Implant Rehabil Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Purpose: Osteoclasts causing pathological bone destruction may constitute sub-populations different from normal osteoclasts mediating normal bone remodeling. Identification of the molecules specifically or selectively expressed in osteoclasts formed under the pathological environments could lead to realize the specific regulation of pathological bone destruction. In the current study, we investigated culture conditions that induce the pathologically, activated osteoclasts by estimating the image of bone resorption using the acid-sensitive fluorescence probe. We have also examined a possible involvement of Kindlin-3, the essential integrin for normal osteoclast differentiation, in pathological bone destruction. **Materials & Methods:** Osteoclasts were formed in the presence of various inflammatory cytokines by use of mouse bone marrow cells. Activity of osteoclasts was analyzed by use the SEM. Bone resorption imaging was traced and quantified using acid-sensitive fluorescence probes. **Results & Conclusion:** Osteoclasts formed in the presence of IL-1 β expressed the highest bone resorption activity. In addition, By the imaging analysis using a acid-sensitive fluorescence probe, we have detected a large amount of protons secreted from Osteoclasts formed in the presence of IL-1 β . Expression of Kindlin-3 was significantly suppressed by the addition of IL-1 β . Osteoclasts formed in the presence of IL-1 β could be the pathologically activated osteoclasts.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-71 象牙質中の DSPP 由来タンパク質の加齢に伴う変化について

○丹羽 堯彦¹, 長野 孝俊¹, 五味 一博¹, 山越 康雄²

¹鶴大 歯 歯周病

²鶴大 歯 生化

象牙質は容量で 45%が無機質, 33%が有機質, 22%が水分で構成されているが, 加齢に伴ってそれらの成分がどのように変化しているか明らかにされていない。【目的】本研究では加齢に伴う歯根象牙質中の非コラーゲン性タンパク質である象牙質シアロリントタンパク質 (DSPP) を構成する象牙質シアロタンパク質 (DSP) および象牙質リントタンパク質 (DPP) の変化を調べることを目的とした。【方法】生後約 5 ヶ月のブタ第一, 第二大臼歯 (6m-1, 6m-2) および 12 ヶ月のブタ第一, 第二, 第三大臼歯 (12m-1, 12m-2, 12m-3) と 17 歳, 44 歳, 74 歳のヒト第三大臼歯 (17y-3, 44y-3, 74y-3) より歯根分岐部を調製し, 密度と体積の測定後, DSP および DPP を抽出して電気泳動およびウェスタンブロッティングによりそれらタンパク質の変化を調べた。【結果】ブタ試料では, 象牙質の密度は 12m-1>12m-2>6m-1>12m-3>6m-2 の順で高く, 体積は 12m-2>12m-1>6m-1>12m-3>6m-2 の順で高かった。ヒト試料では密度, 体積とも各年齢間でほぼ同じであった。DSPP 由来タンパク質のうち DPP はブタ試料においては 6m-2=12m-3>6m-1>12m-2>12m-1 の順で多く認められた。また DSP は 6m-2 と 12m-3 においては高分子 DSP が観察されたものの 6m-1, 12m-1, 12m-2 の試料では分解された DSP が観察された。ヒト試料においては 17y-3 試料では DPP 特有の二重バンドが SDS-PAGE 上で観察されたが, 44y-3 および 74y-3 試料では DPP が分解したスミアのバンドが観察された。【結論】象牙質の組成成分は加齢に伴って変化し, DSPP 由来タンパク質は歯根象牙質中では transient な成分であることが分かった。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

DSPP-derived proteins are transient components of root dentin

○Niwa T¹, Nagano T¹, Gomi K¹, Yamakoshi Y²

¹Dept Periodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Dentin is approximately 45% inorganic material, 33% organic material and 22% water by volume. It is unclear how its composition changes with time following its initial depositions. **Objectives:** To assess if the dentin composition changes over time. **Methods:** We used three non-carious porcine first (6m-1, 12m-1), second (6m-2, 12m-2) and third (12m-3) molars [m = month], and human third molars from 17-, 44- and 74-year-old subjects (17y-3, 44y-3, 74y-3) [y = year]. Following the measurement of density and volume, DSPP-derived proteins were isolated from each sample and characterized by SDS-PAGE and Western blotting. **Results:** Among the porcine samples, the dentin density from high to low was in the order: 12m-1, 12m-2, 6m-1, 12m-3 and 6m-2, while volume was in the order: 12m-2, 12m-1, 6m-1, 12m-3 and 6m-2. Neither the density nor the volume was significant differences among the human samples. In porcine samples, the amount of DPP from high to low was in the order of 6m-2 = 12m-3, 6m-1, 12m-2 and 12m-1. The human DPP doublet band was detected in 17 year-old intact samples, but was not detected in inner dentin removed samples. **Conclusions:** We demonstrated that dentin compositions changes with age and DSPP-derived proteins were transient compositions in root dentin.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-72 完全脱臼歯の歯周組織再生におよぼす保存液の影響に関する組織学的検討

○Hasan Riasat^{1,2}, 建部 廣明¹, 入江 一元¹, 斎藤 隆史²

¹北医療大 歯 組織

²北医療大 歯 う蝕制御治療

Histological examination on the effect of tooth storage media on the periodontal tissue regeneration

○Hasan R^{1,2}, Takebe H¹, Irie K¹, Saito T²

¹Div Histol, Health Sci Univ of Hokkaido Sch Dent

²Div Clinic Cariol Endodont, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Purpose: Dental avulsion is a type of traumatic injury characterized by the complete displacement of the tooth from its socket. In case, immediate re-implantation is not possible, an easily available tooth storage media is required to preserve the tooth after avulsion. Milk and Hank's balanced salt solution (HBSS) is recommended as tooth storage media. Egg white has also reported to be comparable with milk as a storage media for avulsed teeth. However, there are few histological evidences on periodontal ligament (PDL) preservation and regeneration, of avulsed teeth after stored in storage media. The present study was aimed to histologically evaluate the effect of tooth storage media on the periodontal tissue. **Materials and Methods:** Six week SD male rats' maxillary first molar teeth were extracted under general anesthesia. In the experiment HBSS, milk and egg white were used as tooth storage media. Extracted teeth were immersed in three different tooth storage media for one hour. Then some samples were fixed immediately and some samples were transplanted in a receiving pocket within the abdominal wall. In control group, extracted teeth were fixed or transplanted immediately after extraction. One week and two week after transplantation, rats were fixed and the teeth were carefully excised with the surrounding tissue. Soft x-ray was taken and then examined histologically & immunohistochemically. **Result and Discussion:** After one hour immersion in three tooth storage media, the sample which were not transplanted, showed less number of PDL cell and PDL cell layer in milk group. After one week- in egg, milk and HBSS group; epithelial cell rests of Malassez (ERM) increases the number of cell and make cluster compared to the control group. After two week in HBSS group ERM cell numbers were reduced and similar to the control group. Milk and egg group ERM cell number were reduced but still large. Formation of alveolar bone was observed, after two weeks of transplanted tooth. Among all of them, only milk group showed ankylosis. Many cathepsin K positive cells were observed around the alveolar bone and ankylosis area in two week milk group. **Conclusion:** In this study, after one hour immersion in milk, less PDL cell number and cell layer found; as a result after two week ankyloses might occur. HBSS and egg white groups showed better preservation of PDL. Concerning the availability, egg white is suitable tooth storage media for avulsed tooth.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-73 Substance P によるマウス骨芽細胞の骨形成に対する NK1 受容体ノックダウンの影響について

○豊留宗一郎^{1,2}, 倉本恵梨子¹, 岩井 治樹¹, 山中 淳之¹, 吉村 卓也², 中村 典史², 後藤 哲哉¹

¹鹿大 院医歯 機能形態

²鹿大 院医歯 顎顔面外科

【目的】 知覚神経の神経ペプチドの1つである substance P (SP) は神経伝達物質としての働きのみならず神経から出されるモジュレーターとしての働きを有する。SP は受容体である neurokinin-1 (NK1-R) 受容体を介して骨芽細胞の骨形成を調節しており、骨芽細胞の分化後期 (骨形成期) に NK1 受容体が発現することが明らかとなっている。この研究では、骨芽細胞の NK1 受容体を CRISPR/Cas9 system を用いてノックダウンすることにより、骨芽細胞の骨形成にどのような影響があるかを明らかにする事を目的とする。

【方法】 生後4日のマウス頭蓋骨から初代培養系骨芽細胞を採取し、骨芽細胞用培地にて培養した。24穴プレートに 2.0×10^5 個/well 継代し、細胞の増殖を待って NK-1R CRISPR/Cas9 KO Plasmid (Santacruz) を Lipofectamine 3000 (ThermoFisher scientific) を用いてトランスフェクションを行った。プラスミドのトランスフェクションは GFP 発現にて確認を行った。トランスフェクション後 SP を添加した骨形成培地で培養したところ、2週間で石灰化を認めたため、Von Kossa 染色を行い石灰化のレベルを評価した。合わせて RNA 抽出を行い、real-time PCR にて NK1 受容体の発現について mRNA レベルでの評価を行った。

【結果と考察】 骨芽細胞の NK1 受容体のノックダウンに関しては、NK-1R CRISPR/Cas9 KO Plasmid を用いる事によって Lipofectamine を用いても高率に導入される事が明らかとなった。また、NK-1R CRISPR/Cas9 KO Plasmid を導入した細胞は NK1 受容体の発現が抑制され、骨芽細胞による骨形成が抑制される事が明らかとなった。従って、今回の CRISPR/Cas9 を用いた方法は、骨芽細胞内の NK1-R と骨形成関連シグナル伝達機構の関連の解明に有効である事が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The effects of neurokinin-1 receptor knockdown on substance P-induced osteogenic differentiation in mouse osteoblast

○Toyodome S^{1,2}, Kuramoto E¹, Iwai H¹, Yamanaka A¹, Yoshimura T², Nakamura N², Goto T¹

¹Dept Anat Oral Sci, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Dept Oral Maxillofac Surg, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Substance P (SP), a neuropeptide from sensory neuron, works not only as a neurotransmitter but also as a neuromodulator. SP modulates the bone formation of osteoblasts through the SP receptor, a neurokinin-1 receptor (NK1-R). The purpose of this study was to examine the effects of NK1-R knockdown on SP-induced osteogenic differentiation by means of CRISPR/Cas9 system.

Primary osteoblast cells were isolated from 4-day-old mouse calvarias. Cells were cultured at 2.0×10^5 cell/well in 24-well culture dishes. Cells were then transfected NK-1R CRISPR/Cas9 KO Plasmid (Santacruz) using Lipofectamine 3000 (ThermoFisher scientific). The ratio of transfection was examined by the expression of GFP. Transfected cells were cultured in SP-containing osteogenic medium for 2 weeks, and bone formation was checked by von Kossa staining. The expression of NK1-R was measured by real-time PCR.

Using NK-1R CRISPR/Cas9 KO Plasmid, NK1-R in osteoblast was found to be highly transfected by Lipofectamine. The cells transfected NK-1R CRISPR/Cas9 KO Plasmid were inhibited the expression of NK1-R, and decreased the bone formation. Therefore, these results suggested that NK-1R CRISPR/Cas9 KO system was useful for the investigation of the relationship between NK1-R related bone formation and intracellular signal transduction of osteoblasts.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-74 ヒト乳歯幹細胞におけるビリルビン添加による細胞生存への影響

○友田恵利佳^{1,2}, 山座 孝義¹, 山座 治義², 田中 陽介¹, 園田聡一朗¹, 野中 和明²,
久木田敏夫¹

¹九大 院歯 分子口腔解剖

²九大 院歯 小児口腔

【目的】先天性胆道閉鎖症の患児では、緑色歯や歯の発生遅延が臨床的に認められる。これらは、先天性胆道閉鎖症に伴う高ビリルビン血症が象牙芽細胞の機能を障害することが原因と考えられる。我々は、象牙芽細胞の幹細胞である乳歯幹細胞において、ビリルビンが象牙質の形成を障害する事を、過去の歯科基礎医学会で報告した。今回、我々は、ビリルビンによる乳歯幹細胞の細胞死に与える影響について *in vitro* での検討を行った。【方法】ビリルビンを添加した培地にて、健常乳歯より単離した乳歯幹細胞を培養し、細胞の生存率、細胞死、細胞内シグナルの解析を行った。【結果】ビリルビン刺激乳歯幹細胞群では、ビリルビン非刺激乳歯幹細胞群と比較して細胞の生存が著しく低下していた。この細胞生存数の低下は、Annexin-V 陽性 7AAD 陽性細胞ならびに TUNEL 陽性細胞の増加と正に関係していた。また、ビリルビン刺激群では、Erk1/2 ならびに Akt のリン酸化が減少し、NF- κ B のリン酸化は上昇していた。次に、ビリルビン刺激を中断し、正常培地で培養した。この場合、細胞死を示す Annexin-V 陽性 7AAD 陽性細胞ならびに TUNEL 陽性細胞は減少し、また、ビリルビン刺激による細胞内シグナルのリン酸化異常も正常状態と同等のレベルに回復した。【考察】以上の結果より、ビリルビンは、乳歯幹細胞に対し Erk, Akt の経路を抑制し、NF- κ B の経路を活性化することで細胞死を誘導することが示唆された。また、ビリルビンの刺激は可逆的なものであることも示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Bilirubin induces cell death of human deciduous teeth-derived stem cells

○Tomoda E^{1,2}, Yamaza T¹, Yamaza H², Tanaka Y¹, Sonoda S¹, Nonaka K², Kukita T¹

¹Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Pediatr Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Purpose: Pediatric patients with biliary atresia express green pigmentation of deciduous teeth and dentin hypoplasia, because the hyperbilirubin impairs dentin formation in deciduous teeth. We reported that bilirubin impairs the odontogenic function of stem cells of odontoblasts, deciduous teeth-derived stem cells.

Methods: In this study, we examined whether bilirubin impairs survival of deciduous teeth-derived stem cells. **Results:** Bilirubin stimulation reduced the cell viability of deciduous teeth-derived stem cells and increased the number of Annexin-V- and 7AAD-double positive cells and TUNEL positive cells. Bilirubin downregulated phosphorylation of Erk1/2 and Akt and upregulated phosphorylation of NF- κ B in deciduous teeth-derived stem cells. When the bilirubin stimulation was broken, the enhanced cell death and altered cell signaling in deciduous teeth-derived stem cells were recovered similar status to healthy deciduous teeth-derived stem cells. **Conclusion:** These findings indicate that bilirubin induced cell death of deciduous teeth-derived stem cells via alternation of Erk1/2, Akt and NF- κ B and also suggest that bilirubin exhibits reversible effects on deciduous teeth-derived stem cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-75 胎仔マウス顎下腺の分枝形態形成における integrin $\beta 1$ subunit の役割

○足立 圭亮¹, 水越 堅司², 小山 典子², 村松 泰徳¹, 柏俣 正典²

¹朝日大 歯 口外

²朝日大 歯 薬理

【目的】胎生期の唾液腺は上皮組織と間葉組織で構成されており、発達にともなって上皮が形態変化することで器官形成が進行する。胎生期マウスの唾液腺は無血清培地に浮かべた Nucleopore 膜に静置することで器官培養が可能である。培養中の唾液腺は生体内と同様に器官形成が進行して導管系が構築される。これらの現象は分枝形態形成と呼ばれ、すべての外分泌腺、腎臓や肺など、様々な器官形成を制御する重要なメカニズムである。分枝形態形成は器官を構成している上皮と間葉の上皮-間葉相互作用で制御されていると考えられており、これらの制御因子には細胞成長因子や細胞接着因子などが関わっていると報告されている。本研究では、分枝形態形成における細胞接着因子の1つである integrin、特に integrin $\beta 1$ subunit の役割を明らかにするために詳細な検討を行った。【方法】胎生 13 日 ICR 系マウスから顎下腺原基を採取し、integrin $\beta 1$ 中和抗体 (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した DMEM/F12 無血清培地に浮かべたポリカーボネート膜上で器官培養を行い、中和抗体で抑制される分枝形態形成について調べた。また、 $\beta 1$ 中和抗体の上皮への直接的な作用を確認するために、間葉を除いた上皮のみをマトリゲル中で三次元培養を行い、分枝形態形成に対する効果を確認した。さらに、主要な integrin ファミリーの経時的な発現量の変化についてもリアルタイム RT-PCR を用いて解析を行った。現在、ERK1/2 のリン酸化状態についてイムノブロット法によって解析中である。【結果と考察】Integrin $\beta 1$ の mRNA は顎下腺発生の初期 (E12 と 13) に高い発現量を示した。Integrin $\beta 1$ の中和抗体は顎下腺の分枝形態形成を有意に抑制し、さらに EGF による cleft formation を有意に抑制した。しかし、FGF10 による stalk elongation の抑制は認められなかった。以上の結果より、integrin $\beta 1$ はマウス顎下腺分枝形態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Role of $\beta 1$ integrin in branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands

○Adachi K¹, Mizukoshi K², Koyama N², Muramatsu Y¹, Kashimata M²

¹Dept Oral Maxillofac Surg, Asahi Univ Sch Dent

²Dept Dent Pharmacol, Asahi Univ Sch Dent

Introduction: Branching morphogenesis (BrM) is a dramatic developmental process for formation of many organs including salivary glands. In this study, we demonstrated the role of integrin $\beta 1$ subunit in BrM of developing mouse SMG. **Materials and Methods:** E13 (embryonic day 13) SMG rudiments of mice were cultured on a membrane filter on DMEM/F12 medium with or without neutralizing antibody for integrin $\beta 1$. After 24 and 48 hr, the number of endpieces of rudiments were counted. Moreover, the epithelium of rudiment was separated and cultured with Matrigel with or without the antibody. The levels of mRNAs for integrin family in rudiments were estimated by real time RT-PCR. In addition, the immunoblotting experiment is in progress to analyze the phosphorylated ERK1/2. **Results and Discussion:** The mRNA level of expression for integrin $\beta 1$ was highly at early stage of developing SMG. BrM of SMG was significantly suppressed by the neutralizing antibody. Cleft formation induced by EGF was significantly suppressed by the antibody. However, the stalk elongation induced by FGF10 was not suppressed. These results suggest that integrin $\beta 1$ have critical role for BrM of SMG rudiment of fetal mouse.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-76 マウス臼歯舌下移植後の歯髄治癒過程における IGF binding protein 5 の役割について

○斎藤浩太郎, 大島 勇人

新潟大 院医歯 硬組織形態

【目的】今回我々は、ドキシサイクリン (dox) でヒストン結合 GFP 発現制御が可能なノックインマウス (tetOP-H2B-GFP マウス) を用いて歯髄幹細胞/前駆細胞と思われる細胞をラベルし、歯冠部の舌下移植後の歯髄恒常性維持における IGF binding protein 5 (IGFBP5) の役割について解析した。

【方法】生後 3 週齢の野生型マウスおよび胎生 14 日齢に dox を投与した tetOP-H2B-GFP マウスの上顎第一臼歯を抜去後、歯根を切除し、舌下部へ移植した。術後 1 週から 2 週に、または対照群として胎生 15 日から生後 6 週齢で灌流固定し、EDTA 脱灰後に抗 IGFBP5, 抗 GFP, TUNEL 染色を光顕にて観察した。

【結果および考察】歯の発生過程において、生後 1 週までは歯髄/歯乳頭内に広範に IGFBP5 陽性反応が認められ、生後 2 週以降、象牙芽細胞下層の細胞に強い陽性反応が見られた。また、生後 4 週齢以降の歯髄において、歯髄中央部血管周囲に加え、象牙芽細胞下層に GFP 陽性ラベル細胞が局在しており、象牙芽細胞下層の GFP ラベル細胞は IGFBP5 を共発現していた。歯冠部の舌下移植後 1 週から 2 週において、歯髄内広範に IGFBP5 陽性反応が認められ、また、多数の GFP ラベル細胞が歯髄内に維持されていた。さらに、これらのラベル細胞は IGFBP5 を共発現していたが、TUNEL 染色は陰性であった。以上より、IGFBP5 は歯の損傷後の歯髄治癒過程において、歯髄細胞のアポトーシスを抑制し、歯髄の恒常性維持に重要な役割を演じることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The role of IGF binding protein 5 in the healing process of dental pulp following tooth crown transplantation into the sublingual region

○Saito K, Ohshima H

Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Our recent study suggested that allogenic tooth transplantation may affect the maintenance of dental pulp stem/progenitor cells. This study aims to elucidate the role of IGF binding protein 5 (IGFBP5) in the healing process of dental pulp following tooth crown transplantation into the sublingual region in doxycycline-inducible H2B-GFP transgenic mice using immunohistochemistry for IGFBP5 and GFP, and TUNEL assay. Following extraction of the maxillary first molar, the roots were resected and immediately autografted into the sublingual region. During tooth development, IGFBP5-positive cells were broadly observed in the dental papilla/ pulp by postnatal Week 1. During postnatal Weeks 2-6, subodontoblastic cells expressed strong IGFBP5-positive reaction. H2B-GFP label-retaining cells (LRCs) were distributed in the subodontoblastic layer in addition to the center of dental pulp associating with the perivascular environment on postnatal Week 4. These labelled cells in the subodontoblastic layer co-expressed IGFBP5. On postoperative Weeks 1-2, IGFBP5-positive cells were broadly observed in the dental pulp, and GFP-positive LRCs remained in the dental pulp. These LRCs co-expressed IGFBP5 and lacked TUNEL-positive reaction. The results suggest that IGFBP5 plays a role in the maintenance of homeostasis in the healing process of dental pulp following tooth injuries.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-77 抜歯痕修復における間葉系幹細胞の CD91 の機能的役割

○二宮 禎¹, 細矢 明宏², 中村 浩彰²

¹松歯大 総歯研 硬組織

²松歯大 口腔解剖 II

【背景・目的】抜歯後の歯槽骨形成は、抜歯窩の血餅や肉芽組織形成によって間葉系幹細胞(MSCs)が誘導されることから始まる。MSCsは、様々なサイトカイン・ケモカインによって抜歯窩に誘導されると考えられている。しかしながら、MSCsがサイトカイン・ケモカインを感知した後の遊走能に関して、不明な点が残されている。血球系細胞や腫瘍細胞においては、CD91発現が細胞遊走能に関与することが報告されている。本研究では、抜歯痕修復におけるCD91発現と細胞遊走能の関連を検討した。【方法・結果】抜歯痕における骨組織形成を経時的に観察するため、ddyマウス(4週齢,雄)の上顎第一臼歯を抜歯した後、マイクロCTおよび組織化学的手法を用いて評価した。抜歯後5日目に、抜歯痕辺縁部に骨組織形成が認められ、10日目になると、抜歯痕の大部分が骨組織で埋められた。CD91陽性細胞は、抜歯後3日目に抜歯痕の組織内に点在し、5日目以降においても、骨組織を取り囲む線維性組織中に存在が認められた。さらに、CD91発現は、新たに形成された骨組織表面および内部の骨芽細胞や骨細胞にも認められた。次に、CD91の機能を解析するため、骨髄由来間葉系幹細胞(BMSCs)と頭蓋骨由来骨芽細胞(OBs)のCD91発現をsiRNAによりノックダウン(KD)した。CD91KDは、BMSCsとObsの細胞増殖、骨芽細胞分化および硬組織形成に作用を与えなかった。ボイデンチャンバーを用いて、BMP2誘導性の細胞遊走能を評価した結果、CD91KD BMSCsおよびObsは、いずれも細胞遊走能が低下した。【結論】以上の結果より、抜歯後、CD91陽性細胞は、抜歯痕に遊走され、抜歯痕修復に寄与することが明らかにされた。そして、CD91は、BMSCsやObsの遊走能を制御することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

CD91 expression of mesenchymal stromal cells in socket of tooth extraction

○Ninomiya T¹, Hosoya A², Nakamura H²

¹Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ

²Dept Oral Histol, Matsumoto Dent Univ

The regeneration of alveolar bone after tooth extraction is initiated by migration of mesenchymal stem cells (MSCs). It had been reported that MSC migration to the injured site is induced by chemokine or cytokine in granulation tissue. However, the migration capacity of MSCs related to the healing dental socket remains to be conclusively demonstrated. In the present study, we examined the function of CD91 in MSCs after tooth extraction. Mice with extraction of maxillary first molar were evaluated bone formation in dental socket by micro CT and histological analysis. These analyses showed that bone tissues were formed at the edge of the dental socket on day 5 after tooth extraction. CD91-positive cells appeared in tissue within socket on day 3. CD91 was expressed on osteoblasts and osteocytes around or within newly formed bone tissue. Subsequently, CD91 expression in bone marrow derived MSC (BMSC) was down-regulated by siRNA to examine the function of CD91. Down-regulation of CD91 did not effect on the osteoblast differentiation and the bone formation, but reduced BMP-2 induced migration capacity of BMSC. Taking these results, we conclude that CD91 positive cell contributes the healing dental socket and CD91 regulates a migration capacity of MSCs.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-78 OVA 喘息モデルマウスにおける機械的アロディニア

○曹 愛琳^{1,2}, 吉本 怜子³, 合島怜央奈², 張 旌旗¹, 城戸 瑞穂²

¹九大 院歯 分子口腔解剖

²佐賀大 医 組織・神経解剖

³九大 院歯 歯周

Tactile allodynia in OVA-induced asthma model mice

○Cao AL^{1,2}, Yoshimoto R³, Aijima R², Zhang JQ¹, Kido M²

¹Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent Sci

²Div Anat Physiol, Fac Med Saga Univ

³Sect Periodontol, Kyushu Univ Grad Sch Dent Sci

Purpose: There found increasing number of patients who suffer atopic diseases such as asthma or atopic dermatitis. Although, the affected patients are likely to hypersensitive skin and mucosa to tactile stimulation, it is not clearly understood. Unpleasant feeling seems to suffer more in the orofacial region than other part of the body. To explore whether atopic diathesis affect sensory perception, we examined orofacial allodynia asthma model mice. **Methods:** 6-week-old male mice were intraperitoneally administered with ovalbumin (OVA) and aluminum gel (Alum) every three weeks. PBS or Alum injected mice were used as control. 14 days after the sensitization, OVA solution was inhaled for 4 days to induce asthma. Von Frey test to facial region was performed all three groups. After the behavior test the mice were transcardially perfused with paraformaldehyde and the extracted tissues were immunohistochemically examined. **Result and Conclusion:** OVA sensitized mice showed significantly sensitive to mechanical stimulation to facial region compared with the control groups. In the trigeminal ganglion and spinal cord the number of Iba-1 immunoreactive cells was larger in the OVA sensitized mice than in the PBS or Alum-injected mice. Our data suggested that OVA sensitization was associated with tactile allodynia.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-79 マウスメッケル軟骨におけるセプトクラストの局在

○坂下 英^{1,2}, 坂東 康彦¹, 崎山 浩司¹, 天野 修¹

¹明海大 歯 解剖

²明海大 歯 口腔顎顔面外科 II

【目的】メッケル軟骨は第一鰓弓由来の硝子軟骨であり、最前部と最後部を除いて出生前に消失するが、その機構には不明な点が多い。本研究では、骨端板の未石灰化軟骨基質を吸収するセプトクラストに注目し、特異的に発現する表皮型脂肪酸結合タンパク (E-FABP) を指標として、マウス胎仔メッケル軟骨を免疫組織化学的に検索した。【方法】胎生 15 日齢 (E15)~E18 の ddy マウスを固定し、DAB 発色による免疫染色、レーザー顕微鏡を用いた二重染色と三次元形態の観察、隣接切片の von Kossa 染色、TRAP 染色を行った。【結果】E-FABP 免疫陽性セプトクラストは E16 の切歯歯胚に面するメッケル軟骨中間部の吸収面に初めて認められ、さらに E17 で吸収が進行するとその数が増加した。また E18 で吸収がより進行すると、ほとんど認められなくなった。また von Kossa 陽性の石灰化部位にセプトクラストは存在しなかった。また、隣接切片において F4/80 陽性マクロファージは認められず、TRAP 陽性破骨細胞はセプトクラストよりやや後方に存在していた。三次元的形態解析では、セプトクラストは紡錘形の細胞体から伸びた数本の突起をもっていたが、突起をもたないタイプや扁平な細胞体のタイプ等も認められた。【考察】セプトクラストは破骨細胞に先行しメッケル軟骨の未石灰化軟骨基質を吸収し、その後方では骨細胞が石灰化軟骨基質を吸収する事で軟骨組織の吸収に関与していると考えられた。また、セプトクラストは軟骨吸収初期から吸収末期においてその突起の数、吸収面に沿った細胞数の変化が認められる事からセプトクラストの数や形態は軟骨吸収活性と関連することが示唆された。さらにセプトクラストでの強い E-FABP の発現は、メッケル軟骨吸収に脂肪酸による調節機構が存在することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Localization of septoclasts in mouse Meckel's cartilage

○Sakashita H^{1,2}, Bando Y¹, Sakiyama K¹, Amano O¹

¹Div Anat, Meikai Univ Sch Dent

²Div Oral Maxillofac Surg II, Meikai Univ Sch Dent

Meckel's cartilage (MC) originates from the first branchial arch and degenerates before birth except for the most anterior and posterior portions. However, the resorption mechanisms of MC were still not clear. Septoclasts expressing epidermal-fatty acid-binding protein (E-FABP) localize in the growth plate and resorb uncalcified cartilage matrix. In this study, we investigated the localization and morphological changes immunohistochemically using anti-E-FABP antibody in mouse MC. Septoclasts immunopositive for E-FABP were initially recognized at the resorption sites of the intermediate portion of MC. At E17, many septoclasts were distributed along the resorption surface of the anterior portion of MC, but they decrease in number toward E18, and were not recognized in von Kossa-positive calcified matrix. F4/80-positive macrophages were not recognized near septoclasts. TRAP-positive osteoclasts localized along the calcified matrix. Three-dimensional analyses by a confocal laser-scanning microscope revealed that septoclasts in MC showed spindle-shaped cell body accompanying several short processes elongating toward the resorption surface. In addition, septoclasts with non-spindle-shaped cell body or without cell processes were also found. These results suggest that septoclasts participate in the resorption of uncalcified matrix during the regression of mouse MC, fatty-acids regulate MC resorption via septoclasts.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-80 基底膜分子 Nephronectin は EGF like repeat domain を介して歯原性上皮幹細胞の細胞増殖を制御する

○新井智映子¹, 吉崎 恵悟¹, 宮崎佳奈子¹, 韓 雪¹, 鮎田 啓太¹, 福本 敏², 高橋 一郎¹

¹九大 院歯 矯正

²東北大 院歯 小児歯

歯を含む様々な器官の発生は上皮-間葉相互作用によって開始されるが、基底膜はそのシグナルを仲介する足場として重要である。今回我々は、歯に強く発現する基底膜分子 Nephronectin (Npnt) に着目し、以下の検討を行った。まず、RT-qPCR 法および免疫染色法を用いて歯の発生期における Npnt の発現パターンを解析した。Npnt は歯、肺および腎臓に強く発現し、歯においては特に形態形成期に強い発現を認め、基底膜に局在していた。生後 1 日齢切歯を用いて免疫染色法を行い、サービカルループ近傍において歯原性上皮幹細胞マーカーである Sox2 の発現が減少するとともに Npnt の発現が上昇することを発見した。以上から Npnt は歯原性上皮幹細胞の分化制御に関わっていることが示唆された。その機能を検討するために、歯原性上皮細胞株に Npnt を遺伝子導入したところ、Sox2 陽性細胞数が減少し、細胞増殖能が上昇した。Npnt は EGF like repeat ドメインおよび RGD ドメインを有する細胞外基質分子である。それぞれのドメインの役割を検討するために、それぞれのドメインを欠損させた発現ベクター (Δ RGD-Npnt, Δ EGF-Npnt) を作製した。Npnt および Δ RGD-Npnt を過剰発現させると、Sox2 陽性細胞数が減少し、細胞増殖能が増加したが、 Δ EGF-Npnt を遺伝子導入しても変化が認められなかった。EGF like repeat domain は EGF receptor と結合し、様々なシグナルカスケードを活性化させることが知られている。そこで Npnt を導入してシグナリングを検討したところ、AKT のリン酸化を介して、Cyclin D1 を調節することで、細胞増殖を促進させていることが判明した。以上から Npnt の EGF like repeat ドメインが細胞増殖に重要である可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

A basement membrane protein Nephronectin regulates the proliferation of dental epithelial stem cell through its EGF like repeat domain

○Arai C¹, Yoshizaki K¹, Miyazaki K¹, Han X¹, Funada K¹, Fukumoto S², Takahashi I¹

¹Sect Orthod Dentofac Orthop, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Tooth development is initiated by reciprocal epithelial and mesenchymal interactions. Basement membrane (BM) plays important roles for their signaling interactions. To identify the functions of BM during tooth development, we focused on Nephronectin (Npnt), which is highly expressed in tooth. RT-qPCR revealed that Npnt is highly expressed in tooth, lung and kidney. Npnt is strongly expressed, especially during the early morphogenesis stage in tooth. Near the cervical loop of incisor at post-natal day 1, immunostaining of Npnt in BM showed converse localization to Sox2 positive (Sox2+) dental epithelial stem cells suggesting that Npnt is involved their differentiation. Consistently, Sox2+ cells were significantly reduced and the proliferation increased in Npnt transfectant *in vitro*. Npnt contains EGF like repeat and RGD domain. To identify the domains involved in Sox2 regulation, we generated the constructs those lacked EGF like repeat (Δ EGF-Npnt) or RGD domain (Δ RGD-Npnt). We found Npnt and Δ RGD-Npnt transfectant showed reduced Sox2+ cells and cell proliferation, whereas Δ EGF-Npnt did not. We identified the Cyclin D1 was upregulated through the phosphorylation of AKT by EGF repeat domain of Npnt. These results indicate that EGF repeat domain of Npnt is critical for dental epithelial stem cell proliferation and differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-81 組織透明化と神経トレース技術によるラット三叉神経節細胞の三次元的体部位局在の解析

○千堂 良造^{1,2}, 岩井 治樹¹, 倉本恵梨子¹, 吉村 成美¹, 山口 留奈¹, 山中 淳之¹, 豊留宗一郎^{1,3}, 杉村 光隆², 後藤 哲哉¹

¹鹿大 院医歯 機能形態
²鹿大 院医歯 歯科麻酔全身管理
³鹿大 院医歯 顎顔面外科

【目的】三叉神経節には第一次感覚ニューロンの細胞体が存在し、ここから末梢へと向かう三叉神経はそれぞれが異なる頭頸部領域の体性感覚を受容することが知られている。しかし、個々の三叉神経節ニューロンが感覚を受容する範囲と、その細胞体の三叉神経節における三次元的局在の詳細な関係性は不明であり、三叉神経痛のより正確な治療法開発のために必要な基礎的データとしても解明が待ち望まれるところである。そこで本研究では逆行性トレース法と組織透明化を組み合わせて、三叉神経節における体部位局在について三次元的に解析し、三叉神経節の詳細なアトラスの作製を目指した。

【方法】ラットの歯髄、口腔粘膜、顔面皮膚など、様々な領域に異なる逆行性ト्रेसラー（Fluorogold, Fluoro Ruby, Fast Blue など）を注入して一週間後に灌流固定し、三叉神経節を取り出した。組織透明化を行い、共焦点レーザー顕微鏡で撮影および三次元解析を行った。

【結果と考察】三叉神経節の透明化法として、Advanced CUBIC と iDISCO の2種類を用いたところ、前者ではラット三叉神経節を完全に透明化できず、後者は操作が煩雑であるものの、高い透明性が得られた。三叉神経節の組織透明化には iDISCO が適していることが明らかとなり、従来の解析法で行われていた数十枚の切片の再構築を必要とせず、精度が高く効率的な三次元解析が可能となった。上顎切歯の歯髄ヘト्रेसラーを注入した場合、逆行性標識されたニューロンの細胞体が三叉神経節の第1・2枝分岐部に集団として観察されたのに対し、下顎切歯の歯髄の場合は第3枝の分岐部に標識された細胞体の集団が観察され、神経支配の領域が三次元的に明確に確認できた。一方、感覚毛ヘト्रेसラーを注入した場合、標識された細胞が第1・2枝分岐部を中心に第3枝分岐部にも広がって分布し、広い受容野をもつ神経節ニューロンの存在が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Three-dimensional somatotopic organization of the rat trigeminal ganglion: A combined study using tissue clearing and fluorescent retrograde tracers

○Sendo R^{1,2}, Iwai H¹, Kuramoto E¹, Yoshimura N¹, Yamaguchi R¹, Yamanaka A¹, Toyodome S^{1,3}, Sugimura M², Goto T¹

¹Dept Anat Oral Sci, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Dept Dent Anesthesiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

³Dept Oral Maxillofac Surg, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

The sensory neurons in trigeminal ganglion (TG) innervate the orofacial region. To improve the precision of treatment for trigeminal neuralgia, the precise topographic organization of TG should be elucidated. Thus, we analyzed three-dimensional somatotopy of rat TG using a combination of tissue-clearing and retrograde labeling.

One week after injections of retrograde tracers (Fluorogold, Fluoro Ruby, Fast Blue) into various orofacial regions, the rats (300–400 g body weight) were perfused with 4% formalin. The rat TG was removed and cleared with advanced CUBIC or iDISCO, and then, three-dimensional cytoarchitecture of the cleared TG was observed and reconstructed using a confocal microscope.

Treatment by iDISCO achieved higher-transparency of rat TG than by CUBIC. Further, a combination iDISCO and retrograde labeling clearly revealed that TG neurons innervating the maxillary and mandibular incisors were topographically located in the maxillary and mandibular division of the ipsilateral trigeminal nerve, respectively, whereas distribution of TG neurons innervating the vibrissae were beyond the maxillary division.

These results suggest that some TG neurons have widespread receptive fields. Eventually we found the precise three-dimensional distribution of TG neurons receiving sensory inputs from the orofacial region, which would provide crucial information to better understand of the causes of trigeminal neuralgia.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-82 移植骨髄由来細胞の口蓋腺への遊走と細胞分化

○大谷友加里¹, 玉村 亮¹, 河野 哲朗¹, 鈴木久仁博², 中野 敬介³, 長塚 仁³,
辻極 秀次⁴, 岡田 裕之¹

¹日大松戸歯 組織

²日大松戸歯 生物

³岡大 院医歯薬 口腔病理

⁴岡山理大 理 臨床生命科学 組織病態

【目的】近年、骨髄由来細胞の多分化能が明らかになり、様々な臓器への骨髄由来細胞の関与が報告されている。将来的には、骨髄由来細胞を用いた再生医療への応用が期待される。本研究では骨髄由来細胞を用いた唾液腺組織の再生医療の可能性について検討するため骨髄由来細胞の唾液腺組織、特に口蓋腺構成細胞への分化能について検討を行った。【方法】C57BL/6 野生型マウスおよび同系の GFP トランスジェニックマウスを用い、骨髄移植を行った。野生型マウスに 10Gy の放射線を照射後、GFP マウスから骨髄細胞を採取、野生型マウスの尾静脈から骨髄細胞を移植した。移植後 1, 2, 3, 6ヶ月に口蓋腺組織を摘出、パラフィン切片を作製後、蛍光免疫二重染色を施し組織学的に観察を行った。抗 GFP 抗体および腺房細胞の同定に抗 AQP5 抗体、筋上皮細胞の同定に抗 α SMA 抗体を用い、GFP-AQP5 と GFP- α SMA の組合せで蛍光免疫二重染色を行った。【結果と考察】蛍光免疫二重染色の結果、腺房細胞の細胞質に AQP5 の局在、筋上皮細胞の細胞質に α SMA の局在を認めた。また口蓋腺および周囲組織において少数の GFP 陽性細胞を認めた。移植後 3ヶ月および 6ヶ月においては、腺房細胞の一部に GFP-AQP5 ともに陽性を示す細胞が認められ、同様に、筋上皮細胞の一部において GFP- α SMA ともに陽性の細胞が観察された。以上の結果から、骨髄由来細胞は口蓋腺組織を構成する腺房細胞および筋上皮細胞に分化可能であることが示され、口蓋腺組織の幹細胞となり得る可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Migration and differentiation into palatal glands of transplanted bone marrow-derived cells

○Ootani Y¹, Tamamura R¹, Kono T¹, Suzuki K², Nakano K³, Nagatsuka H³, Tsujigiwa H⁴,
Okada H¹

¹Dept Histol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

²Dept Biol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

³Dept Oral Pathol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

⁴Lab Histopathol, Dept Life Sci, Fac Sci, Okayama Univ of Sci

In recent years, it has been reported that bone marrow-derived cells (BMDCs) were capable of differentiating into multiple cell types of many organs. Therefore the treatment by using BMDCs for the regeneration medicine is expected in the future. We examined whether BMDCs can differentiate into salivary gland cells, especially focused palatal gland cells, in the mice. BMDCs from green fluorescence protein (GFP) mice were transplanted into irradiated syngeneic GFP-negative mice. One, two, three and six months after bone marrow transplantation, the palatal glands were removed and immunohistochemical examinations were carried out. We performed the double-labeled fluorescence immunohistochemistry (IHC) staining to identify the cell type of GFP-positive cells, by using following antibodies: AQP as a marker for the acinar cells and alpha-SMA as a marker for the myoepithelial cells. The double-labeled fluorescence IHC staining demonstrated that GFP-positive cells were detected as secretory cells and myoepithelial cells. These results suggest that BMDCs migrate to palatal glands and differentiate into parenchymal cells of palatal glands. This study can provide the basis for salivary gland regeneration by stem cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-83 唾液腺形態形成における筋上皮細胞の役割について

○井階 一樹, 小野 瞳, 阪井 丘芳

阪大 院歯 顎治

【目的】唾液腺, 涙腺, 乳腺などの外分泌腺や, 腎臓, 肺などの器官の発生過程において, 三次元的な立体構造を形成するために分枝形態形成は必須の現象である. 分枝形態形成は上皮間葉間相互作用によって制御されるが, 上皮性組織としての筋上皮細胞の役割については明らかにされていない. 筋上皮細胞の分枝形態形成における役割を明らかにすることを目的として本研究を開始した. 【方法】胎生期唾液腺における筋上皮細胞の発現を確認するため, 筋上皮細胞のマーカーである α -smooth muscle actin (SMA) の発現時期と発現量を検討した. ICR 系マウスから胎生 15, 16, 17, 18 日齢の唾液腺を摘出し, Western Blotting 法とリアルタイム RT-PCR によりタンパク質と遺伝子の発現を解析した. さらに唾液腺における SMA の局在を免疫組織染色により確認した. また, 胎生 14 日齢の唾液腺を摘出し, SMA の遺伝子をターゲットとする siRNA を添加し, 器官培養を行った. 0, 24, 48, 72 時間後に唾液腺を回収し, 免疫組織染色により唾液腺の形態学的変化を確認し, 筋上皮細胞の分枝形態形成における役割を検討した. 【結果】SMA は, 胎生 16 日齢以降に発現を認め, 唾液腺の発達に伴い発現量の増加を認めた. また, 唾液腺の腺房と介在部導管の基底側に局在していた. siRNA を用いて SMA をノックダウンすると, 唾液腺全体の大きさに変化は認められなかったが, 培養 48 時間後の唾液腺において腺房数の増加を認めた. 【考察】筋上皮細胞は, 唾液腺の形態形成において重要な役割を果たしている可能性が示唆された. 【利益相反】利益相反状態にはありません.

The role of myoepithelial cells in salivary gland morphogenesis

○Ikai K, Ono H, Sakai T

Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

Purpose: In many organs including salivary glands (SG), lungs, and kidneys, branching morphogenesis is an essential process to form three-dimensional structures during embryonic development. This process is regulated by epithelial-mesenchymal interactions, but the role of myoepithelial cells (MECs) of originating in the epithelium has not been fully understood. Here we studied the role of the MECs in branching morphogenesis. **Methods:** In order to identify the expression of MECs in embryonic SG, we examined the expression level of alpha-smooth muscle actin (SMA), a specific marker for MECs. We analyzed the expression of SMA in embryonic SG by Western Blotting and real-time RT-PCR. We also examined the localization of SMA using immunohistochemical staining. To investigate the function of SMA, the morphology in SMA siRNA-treated SG were examined. **Results:** SMA was expressed in E16 SG, and the expression level increased in stages. In addition, SMA was localized to the basal side of the acini and intercalated duct in SG. The number of acinar increased in siRNA-treated SG, though there were no significant differences in organ size. **Discussion:** MECs may play an important role in SG morphogenesis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-84 マウス歯牙形成過程におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能

○上運天太一¹, 出野 尚², 島田 明美², 中村 芳樹¹, 木村 宏³, 立花 誠⁴,
中島 和久², 二藤 彰²

¹鶴大 歯 矯正

²鶴大 歯 薬理

³東工大 院生命理工 生体システム

⁴徳大 疾患酵素学研究セ

発生や分化における細胞系譜特異的な遺伝子発現には、遺伝子周辺のヒストンの翻訳後修飾や DNA メチル化を介したエピジェネティックな制御の関与が知られている。我々はこれまで本学会にて、歯胚発生過程におけるヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) メチル化酵素 G9a が間葉細胞特異的な局在を示し、間葉細胞特異的 G9a 欠損マウス (Sox9-Cre;G9a fl/fl マウス) では間葉細胞の増殖能低下および歯胚の矮小化が起きる事を報告した。今回、歯胚発生に関わる制御分子の発現を間葉細胞特異的 G9a 欠損マウス (G9a cKO マウス) とコントロールマウスについて経時的に比較し、歯胚発生過程における G9a の機能を明らかにする事を目的とした。G9a cKO マウスとコントロールマウスについて E15.5, E16.5, E17.5, P0 の歯胚切片を用い、*in situ* hybridization にて Shh, Gli1, Ptc1/2, Bmp2/4 の発現を調べた。その結果、E17.5 の G9a cKO マウス歯胚における Bmp2/4 の発現は間葉組織に局在し、その発現領域は E15.5 のコントロールマウスと類似していた。同様に Shh, Shh シグナルに関わる機能分子 Gli1, Ptc1/2 の G9a cKO マウス歯胚における発現も、より早期のコントロールマウスにおける発現と類似していた。同様に P0 の G9a cKO マウス歯胚での発現は E17.5 のコントロールマウスの発現と類似していた。したがって、G9a cKO マウスでは歯胚発生の遅延が起きる事が示された。生後 3 週の G9a cKO マウスを CT にて観察したところ第一臼歯の歯冠が矮小で歯根の形成も不完全であることから歯胚発生過程に生じた遅延は回復しないことが分かった。これらの結果から、歯胚間葉に発現する G9a が歯胚に関わる制御分子の発現時期の調節を介して歯牙形成に関わっている可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Essential roles of H3K9MTase G9a during tooth development

○Kamiunten T¹, Ideno H², Shimada A², Nakamura Y¹, Kimura H³, Tachibana M⁴,
Nakashima K², Nifuji A²

¹Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Pharmacol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Biological Sciences, Grad Sch Biosci and Biotechnol, Tokyo Inst of Technol

⁴Inst for Enzyme Res, Tokushima Univ

Posttranslational modifications of histone tails and DNA methylation are known to be involved in the regulation of gene expression during development and differentiation. We previously reported that a histone 3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase (MTase) G9a was specifically enriched in the tooth mesenchyme during mouse development. In this study, we investigated functions of G9a in the tooth development using G9a conditional KO mice. G9a cKO mice showed smaller tooth germs at E16.5 and E17.5, but not at E15.5. *In situ* hybridization revealed that intensively localized expressions of BMP2 and BMP4 mRNA in tooth mesenchyme were observed at E17.5 in G9a cKO mice, which are similar expression patterns to those in Sox9-Cre;G9a fl/+ mice at E15.5. Localizations of Shh and its signaling transcripts, gli, ptc1, and ptc2, in tooth mesenchyme of cKO mice were similar to those at the earlier stage in heterozygote mice. At post-natal day 21, micro CT analysis revealed improper development of the tooth crown and root at the first molar in cKO mice, suggesting that cKO mice did not catch up with control littermates. These results suggest that G9a in the tooth mesenchyme is required for proper tooth development through the regulation of timing of gene expression.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-85 機械刺激を負荷した歯根膜細胞による神経分化誘導機構の解明

○高橋かおり, 吉田 卓史, 若森 実

東北大 院歯 歯科薬理

歯根膜には機械受容器としてルフィニ神経終末が存在する。歯根膜に機械刺激が加わらない場合、歯根膜ルフィニ神経終末の分岐が形成されない (Shi L. et al. Arch. Histol. Cytol., 68, 289-299 (2005))。一方、歯根膜線維芽細胞は神経栄養因子である NGF, BDNFなどを産生している。近年、ヒト歯根膜細胞株とラットの神経細胞株である PC12 との共培養を行うと、PC12 の神経細胞分化が促進されることが報告された (Tomokiyo A. et al. J. Cell. Physiol., 227, 2040-2050 (2012))。歯根膜細胞を介した機械刺激による末梢神経の分化誘導機構は未だ明らかになっていない。そこで我々は歯根膜初代培養細胞に機械刺激を負荷し、産生される神経栄養因子の種類と量の経時的変動に着目し、歯根膜を介した機械刺激による神経分化誘導の制御機構を明らかにしたいと考えた。

ラット臼歯・切歯より歯根膜初代培養細胞を作製した。この細胞は RT-PCR 法により歯根膜線維芽細胞のマーカーである Scleraxis, Periostin などの発現を認めたことにより、歯根膜線維芽細胞であることを確認した。歯根膜初代培養細胞をシリコンチャンバーに播種し、周期的な機械刺激を負荷した細胞より mRNA を採取し、神経栄養因子の経時的発現量の変化を RT-PCR 法, real-time-PCR 法を用いて定量的に評価した。機械刺激後の歯根膜細胞の上清培地をマウス神経芽細胞腫由来である Neuro 2A 細胞の培養液に加え培養し、分化誘導評価を行った。

伸展・圧縮の刺激の違い、伸展率によっても産生する因子の種類や量に変動が見られ、さらに伸展後の上清培地を添加した Neuro2A においては神経突起の伸長が確認された。これらの結果から機械刺激を負荷された歯根膜細胞より産生された神経栄養因子などの産生量の変動により神経終末の分化を調整している可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Elucidation of the neuronal differentiation induction mechanism by periodontal ligament cells by adding a mechanical stimulus

○Takahashi K, Yoshida T, Wakamori M

Div Mol Pharmacol Cell Biophys, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Branches of Ruffini nerve endings, one of the mechanoreceptors, are not formed without mechanical stimuli in the periodontal ligament (Shi et al. Arch Histol Cytol, 68, 289-299 (2005)). Differentiation of PC12 cell to nerve cell is promoted when it co-cultured with human periodontal ligament cell line (Tomokiyo et al. J Cell Physiol, 227, 2040-2050 (2012)). Induction mechanisms of peripheral nerve differentiation after mechanical stimulation to the periodontal ligament cells are not yet clear. To clarify the regulation mechanism of neuronal differentiation induced by mechanical stimuli to the periodontal membrane, we focused on the temporal variation of the types and amount of neurotrophic factors that were produced by the periodontal ligament through mechanical stimuli. We seeded periodontal ligament primary culture cells in a silicon chamber, and we collected mRNA after periodic mechanical stimulation. Difference in stimuli and its strength changed the type and amount of neurotrophic factors. The supernatant medium of the periodontal ligament cell culture after mechanical stimulation was added to Neuro2A cells. The medium induced the extension of neurites. Taken together, the results suggest the possibility that differentiation of nerve endings is adjusted by the products such as neurotrophic factors released from the periodontal ligament cells after mechanical stimuli.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-86 癌細胞群を取り囲む正常細胞群の細胞骨格の解析

○北河 憲雄, 大谷 崇仁, 稲井哲一郎

福歯大 生体構造

【目的】細胞競合は周囲の正常細胞により癌細胞をはじめとする有害な細胞を選択して除去するしくみである。1つの癌細胞とそれを囲む正常細胞群の境界の細胞骨格蛋白質の発現, 局在の解析は近年研究が進んでいる。その一方, 癌細胞群と正常細胞群の細胞集団どうしの境界領域の細胞骨格蛋白質の発現, 局在については不明な点が多い。【方法】本研究では, ヒト表皮由来癌細胞である HSC-5 とヒト表皮由来の非癌細胞である HaCaT 細胞を用いて癌細胞群と正常細胞群の境界領域を調べた。HSC-5 と HaCaT は培地を通すが, 細胞が通過することのできない障壁で区切られた硝子スライド上で一晩培養した。その後障壁を除去して, さらに 1-2 日間培養を行った。細胞骨格を構成する蛋白質の局在は免疫染色にて確認した。【結果と考察】HSC5 は近接する HaCaT の細胞骨格に影響を及ぼした。HSC-5 に近接する HaCaT では, 細胞骨格蛋白質が細胞質全体に発現する細胞と, 細胞骨格蛋白質の発現が大きく低下した細胞が観察された。HSC-5 に近接する HaCaT では, 細胞辺縁への細胞骨格蛋白質の局在が見られなかった。その一方, HSC5 から遠い位置に存在する HaCaT 細胞では細胞辺縁に細胞骨格蛋白質の濃縮が見られた。【結論】本研究により, 細胞骨格を構成する蛋白質の局在の変化が 1つの癌細胞とそれを囲む正常細胞群癌細胞群だけでなく, 正常細胞群の間の細胞競合現象の有用な指標となりうる可能性が示唆された。【利益相反】利益相反状態にはありません。

Analysis of cytoskeleton in normal cells surrounding cancer cells

○Kitagawa N, Ohtani T, Inai T

Dept Morpho Biol, Fukuoka Dent Coll

Cell competition is the mechanism that selects and excludes harmful cells such as cancer cell by surrounding normal cells. State of cytoskeleton in boundary area of single cancer cell and surrounding normal cells is well studied. Although, state of cytoskeleton in boundary area of cancer cell population and normal cell population is not well understood. In this study, state of cytoskeleton in boundary area of cancer cell population and normal cell population were investigated using HSC-5, human epidermal cancer cell line and HaCaT, human epidermal noncancerous cell line. HSC-5 and HaCaT were co-cultured in glass which was separated by a barrier that was passed by medium but not by cells for overnight. Cells were subsequently cultured without barrier for 1-2 days. HSC5 disturbs localization of cytoskeleton at cell periphery of nearby HaCaT. In contrast, distant HaCaT cells shows localization of cytoskeleton at cell periphery. Alteration of localization of cytoskeleton may be useful indicator of cell competition between cancer cell population and normal cell population.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-87 歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への分化における Epiprofin と T-box1 の役割

○酒井 陽^{1,3}, 吉崎 恵悟^{2,3}, 千葉 雄太³, 池内 友子³, 山本 朗仁¹, 日比 英晴¹,
山田 吉彦³

¹名大院医 顎顔面外科

²九大院歯 矯正

³米国立衛生研

歯原性上皮細胞の歯上皮細胞系への誘導の分子機構は未だ解明されておらず、その機能解析は遺伝子欠損マウスの表現型の比較やその発現パターンの解析にとどまっている。その原因の一つとして歯原性上皮細胞は初代培養が非常に困難であり、多分化能を失わず細胞を維持するのが難しいことがあげられる。われわれが株化した Sox2 陽性歯原性上皮細胞 (CLDE 細胞) はエナメル芽細胞に分化するもので、歯の発生において特異的に発現する転写因子を組み合わせると歯原性上皮細胞の分化制御機構の解明に用いることができる。CLDE 細胞とマウスモデルを用いた実験から、Epfm と Tbx1 の制御因子が歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への誘導、分化を制御していることがわかった。Tbx1 は Sox2 発現を誘導し歯原性上皮細胞の維持に必要であると考えられる一方で、Epfm は発現量によってエナメル芽細胞への誘導、増殖、分化の異なる機能をする多機能因子であることがわかった。低発現レベルの Epfm は Epfm/Tbx1 複合体を形成することにより Tbx1 の Sox2 誘導転写機能を阻害して、Epfm が歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への誘導を促進させる。また低発現レベルの Epfm は Tbx1 のプロモータに結合して Tbx1 の発現を誘導する。さらに低発現レベルの Epfm は CLDE 細胞の増殖を促進させるが、高発現レベルの Epfm は CLDE 細胞のエナメル芽細胞への分化を促進する。これらの研究結果からエナメル芽細胞の新たな分化誘導法を導くことができ、これを利用してエナメルマトリックスの発現の制御、さらにはエナメル質再生法の開発に発展できると考える。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The role of epiprofin and T-box1 in enamel epithelial development

○Sakai K^{1,3}, Yoshizaki K^{2,3}, Chiba Y³, Ikeuchi T³, Yamamoto A¹, Hibi H¹, Yamada Y³

¹Dept Maxillofac Surg, Nagoya Univ Grad Sch Med

²Sect Orthod Dentofac Orthop, Kyushu Univ Grad Sch Dent

³NIH NIDCR

Sox2-expressing dental epithelial stem cells differentiate into all dental epithelial cell types, such as enamel matrix-secreting ameloblasts. We previously identified epiprofin (Epfm/Sp6) as a member of the Sp zinc-finger transcription factor family, which is expressed in certain developing ectodermal tissue, such as teeth. In dental epithelium development, Epfm is expressed in the dental epithelium at the early stage and is later restricted to the Inner Dental Epithelium (IDE) and ameloblasts. Epfm KO mice display enamel hypoplasia, hyperdontia and defects in digit and epidermal formation. In Epfm KO teeth, IDE proliferation is reduced and ameloblast differentiation is inhibited. Tbx1, a member of the T-box transcription family, is expressed in the ameloblast lineage, and Tbx1 KO mice show enamel defects due to reduced IDE proliferation and ameloblast differentiation, similar to Epfm KO teeth. In the Epfm KO teeth, Tbx1 expression was inhibited and Sox2-expressing dental stem cells were extended in the presumptive IDE layer. We established the clonal dental epithelial stem cell line CLDE. Using mouse models and CLDE cells, we have found that genetic and functional interactions of Epfm and Tbx1 regulates dental epithelial cell fate to the ameloblast lineage. Our findings provide a new avenue to facilitate enamel organ regeneration.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-88 インプラント周囲炎と歯周炎における細菌叢メタトランスクリプトーム解析

○渡辺 孝康¹, 芝 多佳彦², 加地 博一³, 竹内 康雄², 丸山 史人⁴, 和泉 雄一²,
中川 一路⁴

¹東大 院農生命 食の安全セ 食品病原微生物

²医科歯科大 院医歯 歯周病

³医科歯科大 院医歯 顎顔面外科

⁴京大 院医 微生物感染症

インプラント周囲炎は歯周炎に類似した病態を呈する疾患で、歯周炎の発症・進行に重要な細菌種がインプラント周囲炎でも関わるとの報告もあるが、細菌学的側面を含めたその発症機序は不明である。今回、インプラント周囲炎と歯周炎の病変を同一口腔内に有する国内患者 12 名から、両病変に局在する細菌叢試料を採取し、全 RNA の塩基配列情報を高速シーケンサーにて取得した。データ中の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を調べたところ、細菌叢を構成する細菌種組成に 2 疾患間で差異がみられ、同遺伝子のみを標的とする解析を実施した過去の報告と整合するものであった。その一方で、mRNA の塩基配列から構成した遺伝子発現プロファイルは 2 疾患間で類似傾向にあった。ここで mRNA の由来細菌種を調べると、その組成には疾患間の差異が認められ、2 つの細菌種の量的関係が正の相関を示した共起細菌種のネットワークが疾患毎に特異な形で構成された。以上より、インプラント周囲炎と歯周炎の細菌叢では、主要な遺伝子発現を担う細菌種が異なっており、そのような遺伝子発現プロファイルの相違が 2 疾患の病態や治療感受性の相違に関わる可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Metatranscriptomic analyses of microbiota in peri-implantitis and periodontitis lesions

○Watanabe T¹, Shiba T², Kachi H³, Takeuchi Y², Maruyama F⁴, Izumi Y², Nakagawa I⁴

¹Lab Food-borne Pathog Microbiol, Res Center for Food Safety, Grad Sch Agri & Life Sci, Univ of Tokyo

²Div Periodontol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

³Div Maxillofac Surg, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

⁴Dept Microbiol, Kyoto Univ Grad Sch Med

Peri-implantitis is a periodontitis-like disease in human oral cavity, and little is known in its etiology although association of microbial species responsible for onset and progression of periodontitis is suggested. In this study we obtained nucleotide sequences of total RNA in microbiota samples that were collected from peri-implantitis and periodontitis sites of 12 Japanese patients harboring both lesions. The microbial composition was dissimilar between the two diseases in 16S rRNA-based profiles, which was consistent with previous studies exclusively focused on 16S rRNA. On the other hand, mRNA-based gene expression profiles exhibited similarity between the diseases. The source species of detected mRNA were dissimilar between the diseases, and different form of microbial networks was constructed by co-occurring species that showed positive correlation in their mRNA abundance. It was demonstrated that there was difference of microbial species responsible for the main part of gene expression between peri-implantitis and periodontitis lesions, suggesting association of such difference of gene expression profile with dissimilarity of symptoms or treatment susceptibility between the diseases.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-89 C1q との相互作用を介する化膿レンサ球菌の補体免疫回避機構

○小川真理子, 住友 倫子, 毛利 泰士, 山口 雅也, 中田 匡宣, 川端 重忠

阪大 院菌 口腔細菌

化膿レンサ球菌は、補体免疫系からの回避に関与する様々な因子を産生する。しかし、補体古典系路の開始因子である C1q と作用する菌体分子は明らかにされていない。本研究では、C1q との親和性を認めた endopeptidase O (PepO) に着目し、PepO と C1q の相互作用を解析するとともに、血清中での菌体生存および病原性への影響を検討した。

種々の臨床分離株における PepO の産生を Western blot 法にて確認した結果、PepO の発現は供試した 20 株全ての菌株の細胞質、細胞壁、および培養上清画分に検出された。また、PepO 組換えタンパク質 (rPepO) はヒト C1q と濃度依存的に結合することが、ELISA および分子間相互作用解析により明らかになった。続いて、rPepO と C1q の相互作用に対する NaCl 濃度および pH の影響を ELISA により解析したところ、生理条件以上の NaCl を含有する環境では、rPepO と C1q の結合が抑制された。そして pH が 6.0 以下の条件において、rPepO と C1q は有意に高い結合性を示した。pH 5.0 の条件下にてヒト血清と野生株および *pepO* 欠失株 ($\Delta pepO$) を反応させたところ、血清中における $\Delta pepO$ の菌数増加率は野生株と比較して低下した。同条件下でヒト血清と反応させた菌体の表層構造の変化を走査型電子顕微鏡で観察した結果、 $\Delta pepO$ では野生株と比較して著明な表層構造の破壊が認められた。さらに、マウス皮膚感染モデルを用いて $\Delta pepO$ の病原性への関与を検討した結果、 $\Delta pepO$ 感染による皮膚病巣サイズは野生株感染と比較して有意に小さくなった。

以上の結果より、化膿レンサ球菌は炎症病巣において PepO と C1q の結合により補体古典経路を阻害し、後期補体経路における溶菌を回避する可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Streptococcus pyogenes-produced endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q

○Ogawa M, Sumitomo T, Mori Y, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S

Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Streptococcus pyogenes expresses various virulence factors for evasion from complement-mediated bacteriolysis. However, *S. pyogenes* molecules that interact with complement C1q, an initiator of the classical pathway, remain unknown. In this study, we identified the interaction between *S. pyogenes* PepO and C1q, and examined the effect of PepO on complement pathway.

Enzyme-linked immunosorbent assay and surface resonance plasmon measurement revealed that *S. pyogenes* recombinant PepO (rPepO) bound to human C1q in a concentration-dependent manner. As it is known that pH levels are decreased in inflamed sites, the effect of PepO on evasion from complement immunity and on its virulence *in vivo* was analyzed under low pH condition. PepO exhibited higher affinity for C1q under lower pH condition. A *pepO* deletion rendered *S. pyogenes* more susceptible to bacteriocidal activity of human serum. It was also exemplified by scanning electron microscope observations that *pepO* mutant strain ($\Delta pepO$) showed damaged irregular surface morphology as compared to wild type strain (WT). In mice skin infection model, WT formed significantly larger lesions than $\Delta pepO$.

Our results suggested that the interaction of *S. pyogenes* PepO with human C1q impeded the complement pathway and consequently enabled *S. pyogenes* evasion complement-mediated bacteriolysis at inflammatory locus.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-90 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* における短鎖脂肪酸分泌とジンジパイン産生機構の関連

○佐藤 満成¹, 吉田 康夫², 永野 恵司², 長谷川義明², 武部 純¹, 吉村 文信²

¹愛院大 歯 有床義歯

²愛院大 歯 微生物

【目的】歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* において、その培養上清中に代謝産物として、多量に放出される短鎖脂肪酸やプロテアーゼであるジンジパインが歯周病の発症や進行の増悪因子となる事が示唆されている。我々は今までに、*P. gingivalis* の PGN_0725, PGN_1341 および PGN_1888 タンパク質が酪酸およびプロピオン酸の産生機構において CoA 転移酵素として機能していると報告してきた。本研究では、我々はこの3種の CoA 転移酵素が産生する短鎖脂肪酸の量のジンジパイン産生機構への影響について検討を行った。【方法】*P. gingivalis* ATCC 33277 株において、PGN_0725, PGN_1341 および PGN_1888 タンパク質をコードしている遺伝子を、エリスロマイシン、テトラサイクリン およびアンピシリン耐性遺伝子に置換して不活化した。野生株および変異株の培養上清に含まれる短鎖脂肪酸濃度を GC-MS にて測定した。各株の菌体表面および培養上清中におけるジンジパイン活性を比色法にて測定した。【結果と考察】全ての遺伝子不活化株の培養上清において、野生株と比較して短鎖脂肪酸濃度が減少した。また、遺伝子不活化株の菌体におけるジンジパイン活性には著しい低下が確認されたが、培養上清においては大きな減少は見られなかった。加えて、各株の培養上清に含まれる酪酸濃度と菌体のジンジパイン、特にアルギニンジンジパイン活性の間には正の相関が強く認められた。以上の結果から、*P. gingivalis* において、代謝産物である酪酸がジンジパインの発現に対して、正の調節因子として機能している可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

A relationship between secretion of short chain fatty acids and producing gingipains in *Porphyromonas gingivalis*

○Sato M¹, Yoshida Y², Nagano K², Hasegawa Y², Takebe J¹, Yoshimura F²

¹Div Partial Denture, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

²Div Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Purpose: *Porphyromonas gingivalis* is associated with periodontal disease by secretions of short chain fatty acids (SCFAs) into the culture supernatant and producing gingipains. We reported previously that the PGN_0725, PGN_1341 and PGN_1888 proteins functioned as CoA-transferases to produce butyric acid and/or propionic acid in *P. gingivalis* ATCC 33277. In the current study, we examined whether SCFAs production effected gingipain activities. **Materials & Methods:** We constructed mutant strains lacking PGN_0725, PGN_1341 and/or PGN_1888 gene by replacing with the *erm*, *tetQ* and/or *cepA* cassette. The SCFAs in the culture supernatant were quantified by GC-MS. The gingipain activities on the bacterial surface and in the culture supernatant were measured using synthetic chromogenic substrates by spectrophotometer. **Result & Conclusions:** All mutants lacking PGN_0725, PGN_1341 and/or PGN_1888 resulted in decreases of the SCFAs concentration in the culture supernatant and gingipain activities level on the bacterial surface. Additionally concentration of butyrate in the supernatant strongly correlated with the gingipain activities on the bacterial surface, but not with those in the supernatant. In conclusion, it is possible that butyrate functions as a positive regulator in the production of gingipains in *P. gingivalis*.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-91 齲蝕関連 *Bifidobacterium* の酸産生活性とそのフッ化物による抑制効果

○馬目 歩実¹, 安彦 友希^{2,3}, 川嶋 順子⁴, 福本 敏¹, 高橋 信博²

¹東北大 院歯 小児歯

²東北大 院歯 口腔生化

³東北大 院歯 歯学イノベーションリエゾンセ

⁴東北大 東北メディカルメガバンク 地域口腔健康

【目的】 *Bifidobacterium* は主要な腸内細菌として知られているが、近年、齲蝕病巣にも多数生存していることが明らかとなった。また、*Bifidobacterium* は高い酸産生能とミュータンスレンサ球菌と同じかそれ以上の耐酸性能を持つことから、齲蝕との関連が考えられる。そこで本研究では、口腔由来 *Bifidobacterium* のグルコースからの酸産生と、そのフッ化物による抑制効果について検討した。

【方法】 *Bifidobacterium longum subsp. longum* (*Bl*) JCM 1217, コントロールとして *Streptococcus mutans* (*Sm*) NCTC 10449 を用い、実験は全て嫌気条件下で行った。pH-stat により、pH 7.0, pH 5.5 でのグルコースからの酸産生活性を測定し、さらにフッ化カリウム (KF) の影響について評価した。最終代謝産物は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析した。

【結果】 グルコースからの酸産生量は、*Bl* よりも *Sm* の方が pH 7.0 で約 1.8 倍、pH 5.5 で約 1.6 倍多かった。KF による 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は、pH 7.0 において、*Sm* は 3.0 mM, *Bl* は 60 mM, pH 5.5 において、*Sm* は 0.36 mM, *Bl* は 4.4 mM だった。pH 7.0 においてグルコースから産生された最終代謝産物の比率は、*Sm* では、乳酸：ギ酸：酢酸が 7:2:1 であったのに対し、*Bl* は 0.5:2:7.5 と酢酸の比率が大部分を占めていた。KF を添加した場合でもこの比率はほとんど変化しなかった。pH 5.5 では、*Bl*, *Sm* 共に乳酸の産生比率が 15-20% 増加した。

【考察】 *Bl* は、*Sm* よりも酸産生能は低かったものの、フッ化物に対する耐性が高かったことから、フッ化物を用いた従来の齲蝕予防法には抵抗を示す可能性が示唆された。また、フッ化物は最終代謝産物の比率への影響は少なく、糖代謝上流の段階で作用することが推察された。pH 5.5 では *Bl*, *Sm* 共に乳酸の産生比率が増加したことから、*Bl* は *Sm* と類似した pH 依存性の代謝変換を生ずることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Carbohydrate metabolism of oral *Bifidobacterium* and its inhibition by fluoride

○Manome A¹, Abiko Y^{2,3}, Kawashima J⁴, Fukumoto S¹, Takahashi N²

¹Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent

³Liaison Center Innovative Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

⁴Div Community Oral Health Sci, ToMMo, Tohoku Univ

Objective: *Bifidobacterium* species are known as main intestinal bacteria. Recently, it was reported that they were also detected from caries lesions and that they were acid-tolerant similarly to or more than mutans streptococci, suggesting their relationship with caries. Therefore, this study aimed to investigate the aspect of carbohydrate metabolism of oral *Bifidobacterium* and their sensitivity to fluoride.

Materials and Methods: *Bifidobacterium longum subsp. longum* (*Bl*) JCM 1217 and *Streptococcus mutans* (*Sm*) NCTC10449 as control were used. Acid production from glucose was measured at pH 7.0 and 5.5 by pH-stat under anaerobic conditions in the presence or absence of potassium fluoride (KF).

Results: The acid production from glucose of *Sm* was 1.6-1.8 times higher than that of *Bl* at both pH 7.0 and 5.5. The acid production of *Bl* was over 10 times more tolerant to KF than that of *Sm* at both pHs. The main acidic end-product was lactate in *Sm*, while that was acetate in *Bl*. KF had no effect on the profile of acidic end-product.

Discussion: *Bl* was less acidogenic but more tolerant to fluoride than *Sm*, suggesting *Bl* is resistant to conventional caries prevention using fluoride.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-92 *Streptococcus mutans* における Fructanase の CSP 依存的 Quorum sensing への影響

○鈴木 雄祐^{1,2}, 荒井 俊明^{1,3}, 小倉 直美², 近藤 壽郎², 泉福 英信¹

¹国立感染症研 細菌一

²日大松戸歯 顎顔面外科

³鶴大 歯 口外I

【目的】 *Streptococcus mutans* はう蝕の主な原因菌であり、口腔バイオフィルムの病原性に重要に関わる。バイオフィルム形成と Quorum sensing (QS) は、細菌の生残に重要な因子である。Competence-stimulating peptide (CSP) により刺激される QS は、バクテリオシン産生と遺伝子形質転換に関与している。我々は、Fructanase (FruA) がグルカン形成の基質となるスクロースを分解することで *S. mutans* のバイオフィルム形成を阻害することを報告した。さらに、スクロース非依存的なバイオフィルム形成も阻害することを見出した。そこで本研究では、CSP 依存 QS における FruA の効果を検討した。**【方法】** FruA の CSP 依存 QS への効果をバクテリオシン産生と遺伝子形質転換にて検討した。*S. mutans* GS5 comC 変異株に FruA 処理した CSP を添加し、BHI 寒天培地に穿刺培養後 *Streptococcus* Indicator Strain RP66 を重層し、バクテリオシンにより菌増殖が阻止された範囲を観察した。次に、CSP または *S. mutans* UA159 の菌表層に FruA を作用させ、カナマイシン耐性遺伝子を持つプラスミド pDL276 を添加後、*S. mutans* のカナマイシン耐性遺伝子による形質転換効率を求めた。**【結果】** FruA は CSP 依存的なバクテリオシン産生を濃度依存的に阻害した。CSP に FruA を作用させても遺伝子形質転換効率を阻害しなかったが、菌表層に作用させると阻害した。また、FruA を熱処理すると FruA 処理しない場合と同程度まで遺伝子形質転換効率の回復を認めた。**【考察】** FruA は CSP 依存 QS の阻害効果を有することが認められた。その阻害メカニズムとして、菌表層に作用し阻害することが考えられた。**【結論】** FruA は口腔内において、バイオフィルム形成と QS を阻害し *S. mutans* の生残に影響を与える。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The effects of Fructanase on the competence-stimulating peptide-dependent quorum sensing system in *Streptococcus mutans*

○Suzuki Y^{1,2}, Arai T^{1,3}, Ogura N², Kondoh T², Senpuku H¹

¹Dept Bacteriol I, Natl Inst of Infect Dis

²Dept Maxillofac Surg, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

³Dept Oral and Maxillofac Surg, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Aims: *Streptococcus mutans* is one of etiological agents for dental caries and plays an important role for pathogenicity of the oral biofilm. Biofilm formation and Quorum sensing (QS) system are important factors for bacterial survival. QS system is stimulated by competence-stimulating peptide (CSP) and associated with bacteriocin production and genetic transformation. Fructanase (FruA) inhibited biofilm formation of *S. mutans* by digesting sucrose and, furthermore, sucrose-independent biofilm formation. In this study, we investigated effects of FruA on the CSP-dependent QS system as an additional activity.

Materials and Methods: Effects of FruA on the CSP-dependent bacteriocin production and genetic transformation were examined in *S. mutans* GS5 comC mutant and UA159. CSP or *S. mutans* whole cell were treated with FruA and used for two assays. **Results:** FruA inhibited CSP-dependent bacteriocin production in a dose-dependent manner. FruA inhibited genetic transformation when bacterial cells were treated with FruA. The inhibition was restored by heating of FruA. **Discussion:** FruA had inhibiting activities to CSP-dependent QS system. It was considered that FruA affected bacterial cell surface and inhibited the CSP-dependent QS responses. **Conclusion:** FruA may control the survival of *S. mutans* by inhibiting biofilm formation and QS system in the oral cavity.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-93 分子シャペロン DnaK をターゲットにした低分子化合物を用いた新しいバイオフィーム阻害法の開発

○有田(森岡) 健¹, 永尾 潤^{1,2}, 成田 由香², 橋本麻利江², 田崎 園子², 池崎晶二郎², 長 環², 田中 芳彦²

¹福歯大 先端科学セ

²福歯大 感染生物

バイオフィームは固体表面に形成される微生物のコミュニティであり、バイオフィーム内部の細胞が抗生物質や宿主免疫機構に耐性を示すことで慢性感染症の原因となることが問題となっている。我々は、大腸菌一遺伝子欠損株ライブラリー (KEIO コレクション) を用いた網羅的な解析から、タンパク質の品質管理を担う分子シャペロン DnaK がバイオフィーム形成に重要な役割を果たすことを見出した。本研究では、大腸菌 K-12 株をモデルとして、DnaK の機能を阻害する化合物によってバイオフィーム形成を抑制できるかを検証した。その結果、天然フラボノールの一種である Myricetin が増殖は阻害せず、濃度依存的にバイオフィーム形成を阻害すること (IC₅₀ = 46.2 μM) を発見した。透過型電子顕微鏡により細胞外構造体の産生を観察したところ、Myricetin を添加した場合には *dnaK* 欠損株と同様に、バイオフィーム形成に重要な細胞外アミロイド線維 “curli” の産生が抑制されていることが分かった。また、Myricetin 添加時には、*dnaK* 欠損株と同様の複数の表現型が観察されたことから、Myricetin は DnaK の機能を阻害することで curli に依存したバイオフィームの形成を抑制することが示唆された。また、メチシリン耐性臨床分離株を含む黄色ブドウ球菌に対しても、Myricetin が最少生育阻止濃度以下の濃度でバイオフィーム形成を阻害することを見出した。以上より、Myricetin はグラム陰性菌だけでなく、グラム陽性菌のバイオフィームに対しても有効であり、DnaK が抗バイオフィーム薬の標的となりうることが示された。現在、Myricetin 及びその類縁体を用いてミュータンス菌のバイオフィーム形成にも阻害能があるか検証中である。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Novel strategy for biofilm inhibition using small molecules targeting molecular chaperone DnaK

○Arita-Morioka K¹, Nagao J², Narita Y², Hashimoto M², Tasaki S², Ikezaki S², Cho T², Tanaka Y²

¹Adv Sci Res Cent, Fukuoka Dent Coll

²Div Infect Biol, Fukuoka Dent Coll

Biofilms are complex communities of microorganisms that attach to surfaces. Since cells embedded in biofilms acquire increased tolerance against antimicrobial agents and host immune systems, biofilm-associated infectious diseases tend to become chronic. Recently, our comprehensive analyses using single-gene deletion mutants for *E. coli* K-12 genes revealed that molecular chaperone DnaK is important for biofilm formation. In this study, we examined whether small molecules targeting DnaK could prevent the biofilm formation. A widely distributed flavonol Myricetin inhibited biofilm formation at concentrations (IC₅₀ = 46.2 μM), but did not significantly affect the bacterial growth. Transmission electron microscopic observation demonstrated that Myricetin inhibits production of extracellular amyloid fibrils. Some phenotypic analyses showed that Myricetin alters the phenotypes of *E. coli* wild type cells resembling the consequence of the *dnaK* deletion mutant. These data strongly suggest that Myricetin inhibits cellular functions of DnaK *in vivo*, leading to defects in curli biogenesis and biofilm formation. Interestingly, Myricetin also suppressed biofilm formation of *Staphylococcus aureus* including clinically isolated methicillin-resistant strains at concentrations where their growth was not inhibited. These results altogether provide a more accurate insight into the significance of DnaK in the curli-dependent biofilm formation and also suggest that DnaK is a potential target for anti-biofilm drugs.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-94 *Porphyromonas gingivalis* は補体 C5a と TLR を利用して免疫系から回避する

○前川 知樹¹, 前田 健康¹, 寺尾 豊²

¹新潟大 院医歯 高度口腔機能研セ

²新潟大 院医歯 微生物

【背景】 歯周病の主たる原因細菌 *Porphyromonas gingivalis* は、宿主免疫を調節することで免疫を不活性化する。同時に、*Pg* は軽微な免疫応答を惹起し炎症を引き起こすことで、生存に必要な栄養素を得ている。しかしながら、*Pg* が組織で軽微な炎症を維持しながらも、宿主からの免疫応答を回避しているかは不明である。そこで、歯周病の発症に重要な役割を果たす好中球に焦点をあて、*Pg* の免疫回避機構について分子レベルで検証した。【方法】 好中球の食作用は、マウスを用いたチャンバーモデルによって検索した。MyD88 の分解とユビキチン化は、免疫沈降法とウエスタンブロット法にて検出した。さらに PI3K のリン酸化と RhoA の活性化は、それぞれ ELISA 法と G-LISA 法にて定量化した。好中球のアクチンの重合/脱重合反応は、*Pg* を MOI=10:1 で 60 分感染後に、蛍光顕微鏡下でファロイジン染色により検鏡した。C5a 受容体と TLR2 のクロストークは、蛍光共鳴エネルギー移動法により可視化した。【結果】 *Pg* は TLR2、および MyD88 の両者を攪乱させ、TLR2-PI3K を活性化することで、宿主免疫からの回避を可能にしていることが明らかになった。また、*Pg* は炎症による局所の微小な出血から、栄養分であるヘム鉄を得ると同時に、血液中の補体成分 C5 から免疫作動分子 C5a を切り出すことが示された。そして、切り出された C5a は、好中球の細胞膜上に存在する C5a 受容体の活性化能を有しており、*Pg* による TLR2 活性化とのクロストークを引き起こした。次いで、MyD88 の Ubiquitin による分解を引き起こし、好中球の潜在的な殺菌能を低下させることが明らかになった。さらに、C5a-TLR2 のクロストークは、PI3K を活性化することで好中球の食作用を抑制し、軽微な炎症を引き起こし、*Pg* へのヘム鉄供給に繋がっていた。【考察】 *Pg* は、自然免疫と獲得免疫を同時に攪乱させることで好中球の貪食を回避し、さらには生存に必要なヘム鉄を獲得する巧みな分子機構を有すると示唆された。【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Porphyromonas gingivalis manages complement and TLR signaling to escape bacterial clearance of inflammation

○Maekawa T¹, Maeda T¹, Terao Y²

¹Res Cent for Adv Oral Sci, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Div Microbiol Infect Dis, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Rationale: *Porphyromonas gingivalis* alters select signaling pathways to impair host immunity without significantly affecting the inflammatory response, which serves the nutritional needs of the bacteria. However, the molecular mechanisms by which *Pg* can selectively inhibit immune elimination without blocking inflammation have remained obscure. **Methods:** Phagocytosis assay was performed using Subcutaneous chamber model. MyD88 degradation and ubiquitination were examined by immunoprecipitation and immunoblotting. To determine RhoA activation, stimulated neutrophil lysates were subjected to the G-LISA. To measure actin polymerization, neutrophils were incubated with *Pg* and F-actin levels were determined by phalloidin staining. **Results:** *Pg* causes proteasomal degradation of MyD88 in C5a receptor- and TLR2-dependent manner, resulting in decreased killing of *Pg* by neutrophils. Moreover, same *Pg*-induced C5aR-TLR2 crosstalk induces PI3K signaling which inhibits *Pg* phagocytosis by neutrophils and promotes the induction of a non-host protective proinflammatory response. This subtle manipulation of host signaling pathways is a matter of life and death for *Pg*. If *Pg* caused generalized immunosuppression, this would inhibit bacterial killing, but would also deprive the bacteria of critical nutrients derived from inflammatory tissue breakdown. **Conclusions:** These findings indicate that periodontal bacteria have evolved to evade host immunity in an inflammatory environment that is essential to their persistence. **Conflict of Interest:** The authors declare no competing interests.

P1-95 アメロブラスチンによる炎症性サイトカイン産生増強メカニズムの解析

○大塚 麻衣^{1,2}, 沖永 敏則¹, 有吉 渉¹, 北村 知昭², 西原 達次¹

¹九歯大 感染分子生物

²九歯大 保存

【目的】アメロブラスチン(AMBN)は、歯髄創傷治癒や骨芽細胞の分化促進に関与するなど多様な生物学的特性を担うことが近年報告されている。しかし、そのメカニズムは未だ明らかになっていない部分が多い。今回、AMBNの新しい生理学的機能を明らかにすることを目的として、Lipopolysaccharide(LPS)で刺激したヒトマクロファージ様細胞の炎症応答におけるAMBNの影響について検証した。【材料と方法】Phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)処理によりマクロファージ様細胞へ分化誘導したヒト単球様細胞株(U937細胞)を*Escherichia coli*由来LPSとリコンビナントヒトAMBN(rhAMBN)で刺激した。遺伝子発現をreal time RT-PCR法を用いて、タンパク発現をWestern blot法とELISA法を用いて検証した。【結果と考察】LPS刺激によりU937細胞においてIL-1 β の遺伝子発現上昇を認めた。LPSとrhAMBNの同時刺激によりLPS誘導性IL-1 β の遺伝子発現が顕著に増加し、成熟型のmature IL-1 β と活性型のcaspase-1 p10の発現が著名に亢進した。また、rhAMBNの同時刺激により、細胞上清中のIL-1 β 量が有意に上昇することが明らかになった。一方、caspase-1阻害剤により、rhAMBNによるIL-1 β の発現増強は抑制された。【結論】ヒトマクロファージ様細胞において、rhAMBNはcaspase-1の活性化を介して、LPSが誘導するIL-1 β 産生を増強した。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Ameloblastin enhances the inflammatory response in LPS-treated human macrophage cells

○Otsuka M^{1,2}, Okinaga T¹, Ariyoshi W¹, Kitamura C², Nishihara T¹

¹Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ

²Div Endodont Restorative Dent, Kyushu Dent Univ

Objective: Ameloblastin is known to be important for the tooth development. Recently, some researchers reported that ameloblastin had other various biological functions such as osteogenesis and pulp healing. In the present study, we examined the involvement of ameloblastin in the expression of inflammatory cytokines in human macrophages. **Materials & Methods:** In the present study, we used U937, human monocyte cell line, was pretreated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). The cells were treated with lipopolysaccharide (LPS) derived from *Escherichia coli* and recombinant human ameloblastin (rhAMBN). The gene expression was confirmed by Real Time RT-PCR and the protein expression was detected by Western blotting and ELISA. **Results:** The gene expression of IL-1 β was upregulated in LPS-treated U937 cells, and rhAMBN enhanced LPS-induced IL-1 β gene expression. Interestingly, rhAMBN also upregulated the protein expression of mature IL-1 β and caspase-1 p10 in LPS-treated U937 cells. Furthermore, we confirmed that rhAMBN significantly increased the secretion of IL-1 β in LPS-treated U937 cells by ELISA. Treatment with a caspase-1 inhibitor downregulated the expression of IL-1 β protein enhanced by rhAMBN in LPS treated U937 cells. **Discussion:** These results indicated that rhAMBN enhanced the expression of IL-1 β in LPS-treated U937 cells through caspase-1 activation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-96 *Treponema denticola marR* 様遺伝子の機能解析

○沼田 由美¹, 柴山 和子², 佐藤 亨¹, 菊池有一郎², 国分 栄仁², 石原 和幸²

¹東歯大 クラウン補綴

²東歯大 微生物

Treponema denticola は、慢性歯周炎の病巣より高頻度で分離され、その発症と進行に関与している。我々の先行研究において、*T. denticola* はクロラムフェニコール、オフロキサシン、カナマイシン、リファンピシンに対し低感受性であった。またクロラムフェニコールの存在下において *marR* 様遺伝子および bacteriocin ABC transporter 様遺伝子の発現が増加していた。これらの結果により、*marR* 様遺伝子と bacteriocin ABC transporter 様遺伝子がともに抗菌薬への感受性に関与していることが示唆された。本研究は、*T. denticola* の抗菌薬抵抗性に関連する遺伝子の発現における *marR* 様遺伝子の役割を解析することを目的とした。*marR* 欠損株は、*T. denticola* ATCC 35405 の *marR* 遺伝子内へのエリスロマイシン耐性遺伝子カセット挿入により作製した。欠損株の確認はサザンブロット分析と PCR で行った。また、*marR* 様遺伝子に隣接する遺伝子と bacteriocin ABC transporter 様遺伝子の発現量を、定量的リアルタイム PCR により比較した。その結果、欠損株では *marR* 様遺伝子の下流遺伝子の相対的発現量が著明な増加が見られた一方で、上流遺伝子の発現にはわずかな減少が確認された。さらに、bacteriocin ABC transporter 様遺伝子の発現も増加した。これらの結果より、*T. denticola* において *marR* 様遺伝子は、その下流遺伝子と bacteriocin ABC transporter 様遺伝子の発現制御に関与していることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Functional analysis of *marR*-like gene of *Treponema denticola*

○Numata Y¹, Shibayama K², Sato T¹, Kikuchi Y², Kokubu E², Ishihara K²

¹Dept Crown Bridge Prosthodont, Tokyo Dent Coll

²Dept Microbiol, Tokyo Dent Coll

Treponema denticola is a major pathogen of periodontal disease. In our previous work, *T. denticola* showed low sensitivity to chloramphenicol, ofloxacin, kanamycin, and rifampicin. In the chloramphenicol treated *T. denticola*, *marR*-like gene expression and bacteriocin ABC transporters-like genes were increased. These results suggest that the *marR*-like gene and bacteriocin ABC transporters-like gene are associated with susceptibility against antimicrobial agent. The purpose of this study was to analyze the role of the *marR*-like gene on the expression of the genes associated with resistance against antimicrobial agent in *T. denticola*. To construct the mutant deficient *marR*-like gene, an *ermF-ermAM* cassette was inserted into the locus of the gene in the *T. denticola* ATCC 35405. The insertion was confirmed by Southern blot analysis and PCR. To investigate expression of the flanking genes of *marR*-like gene and bacteriocin ABC transporters, real-time quantitative PCR was carried out. The relative expression of the downstream gene of *marR*-like gene increased significantly in the mutant while the upstream gene was slight decreased. In addition expression of bacteriocin ABC transporters-like genes also significantly upregulated. Taken together, these results suggest that *marR*-like gene functions as regulator, and it controls the expression of downstream gene and ABC transporters-like genes.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-97 アレルギーに関連した新しい T 細胞シグナル分子の機能解析

○橋本麻利江^{1,2}, 永尾 潤一¹, 田崎 園子¹, 池崎晶二郎¹, 成田 由香¹,
有田(森岡) 健一¹, 長 環¹, 湯浅 賢治², 田中 芳彦¹

¹福歯大 機能生物化学 感染生物

²福歯大 診断・全身管理 画像診断

口腔アレルギーは口腔内の環境が原因で起こる歯科口腔領域の疾患で、その患者数は先進国を中心に顕著に増加しており、治療法について社会的関心は高い。口腔アレルギーの病態は、花粉症アレルギーを背景にして交差反応で生じる口腔食物アレルギーや、指輪・ネックレス・ピアス使用者において歯科治療後に生じる口腔金属アレルギーといったように多岐にわたる。何れもヘルパー T 細胞による免疫応答が深く関与している。我々は、ヘルパー T 細胞による免疫応答を制御するシグナル分子として、Rho ファミリー低分子 G タンパク質の活性を制御するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) に着目し、様々な分子の解析を行ってきた。そのなかで、古典的 GEF や DOCK ファミリーとは異なるファミリーの GEF 分子を単離している。ヘルパー T 細胞の各種サブセットへの分化条件におけるこの GEF 分子の発現をウエスタンブロットにより解析したところ、この GEF 分子に関連した新しいシグナル伝達分子が Th2 細胞特異的に発現することを見出した。この新規分子の発現は T 細胞受容体を介した再刺激により増強されることが分かった。Jurkat 細胞株においてこの新規分子を発現させたところ、細胞質に局在することが明らかとなった。また、T 細胞受容体刺激時に NFAT を活性化することも明らかとなった。現在、口腔アレルギーの病態とその制御機構を解明するために、新しく同定した分子の機能解析を進めており、特に、T 細胞の遊走と接着における機能を詳細に解析している。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Functional analysis of a novel T-cell signaling molecule associated with allergic response

○Hashimoto M^{1,2}, Nagao J¹, Tasaki S¹, Ikezaki S¹, Narita Y¹, Arita-Morioka K¹, Cho T¹,
Yuasa K², Tanaka Y¹

¹Div Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll

²Div Image Diagn, Dept Diagno Gene Care, Fukuoka Dent Coll

T helper cells especially Th2 cells play a triggering role in the allergic response. However, the mechanism underlying the differentiation of T helper cells into Th2 cells has not been completely elucidated. Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) stimulate the exchange of GDP for GTP to generate the activated form of Rho GTPase, which is important for cytoskeletal reorganization, gene expression, cell differentiation and migration in T helper cells. Our group has studied various molecules of GEFs belonging to Dbl and DOCK family proteins. We found a novel GEF molecule, which was different from Dbl and DOCK family proteins, expressed specifically in Th2 cells during the differentiation of T helper cells. In this study, we investigated the function of the GEF molecule in Th2 cells to clarify the molecular mechanism of allergy-specific differentiation of T helper cells. The molecular function of the novel GEF molecule in cell differentiation and migration in T helper cells will be reported.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-98 形質転換誘導性タンパク質 Ccs4 が *Streptococcus pneumoniae* の病原性に与える影響

○広瀬雄二郎, 山口 雅也, 後藤 花奈, 住友 倫子, 中田 匡宣, 川端 重忠

阪大 院歯 口腔細菌

Streptococcus pneumoniae はグラム陽性の双球菌で、肺炎や髄膜炎の主たる原因菌である。髄膜炎起因菌の一つである *Neisseria meningitidis* において、Arginine-rich region を有するタンパク質が、ヒト血清中での菌体生存に寄与することが報告されている。NCBI の BLAST による相同性検索を用い、*S. pneumoniae* TIGR4 株のゲノムデータベースより Arginine-rich region を有するタンパク質を検索したところ、形質転換誘導性タンパク質である Ccs4 が Arginine-rich region を持つことが示された。本研究では、*S. pneumoniae* の Ccs4 が病原性に果たす役割を解析した。In silico 解析から、Ccs4 は 9 回膜貫通型タンパクであり、Arginine-rich region は細胞外に局在することが予測された。次に、TIGR4 株を親株として *ccs4* 欠失株を作製し、野生株と *ccs4* 欠失株における増殖を比較したところ、両菌株の増殖速度に有意な差は認められなかった。宿主細胞への付着および侵入能を比較するため、ヒト脳微小血管内皮細胞に野生株もしくは *ccs4* 欠失株を感染させ、培養 1 時間後の付着率および侵入率を算出した。*ccs4* の欠失により、付着率は 65%、侵入率は 25% まで低下した。また、血液中における両菌株の生存率を比較するため、CD-1 マウス血液と野生株または *ccs4* 欠失株を混和し、培養後の菌体生存率を比較したが、有意な差は認められなかった。さらに、Ccs4 が in vivo での病原性に寄与するかについて評価するため、CD-1 マウスの尾静脈から 5×10^6 CFU の野生株もしくは *ccs4* 欠失株を感染させた。その結果、*ccs4* 欠失株を感染させたマウスの生存時間は、野生株感染マウスと比較して有意に延長した。以上の結果より、*S. pneumoniae* の形質転換誘導性タンパク質 Ccs4 は、宿主細胞への付着および侵入に関与することで、本菌の病原性に影響を与えている可能性が示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Competence-induced protein Ccs4 impacts virulence of *Streptococcus pneumoniae*

○Hirose Y, Yamaguchi M, Goto K, Sumitomo T, Nakata M, Kawabata S

Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Streptococcus pneumoniae is a Gram positive diplococci and a major cause of pneumonia and meningitis. *Neisseria meningitidis*, another pathogen causing meningitis, promotes the survival in human serum through an Arginine-rich region of its lipoprotein. BLAST search revealed that the *S. pneumoniae* competence-induced protein Ccs4 showed similarities with the Arginine-rich region. In this study, we investigated whether Ccs4 contributes to the virulence of *S. pneumoniae*. In silico analysis indicates Ccs4 is a 9-pass transmembrane protein and the Arginine-rich region locates in extracellular domain of the protein. To examine the role of Ccs4 in bacterial pathogenesis, we constructed $\Delta ccs4$ mutant strain of *S. pneumoniae* TIGR4. The wild-type and $\Delta ccs4$ strains exhibited a similar growth rate. The $\Delta ccs4$ strain showed significantly lower adhesion and invasion rates to human brain microvascular endothelial cells as compared to the wild-type strain. There were no significant differences between the survival rate of the $\Delta ccs4$ and wild-type strains in mouse blood. In a mouse sepsis model, $\Delta ccs4$ strain-infected mice showed a significantly prolonged survival time as compared to wild-type strain-infected mice. These results indicated that Ccs4 is involved in pneumococcal adhesion to and invasion of host endothelial cells and contributed to the virulence of *S. pneumoniae*.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-99 口腔カンジダ症を制御する T 細胞応答の誘導

○田崎 園子^{1,2}, 長 環¹, 永尾 潤一¹, 成田 由香¹, 橋本麻利江¹, 池崎晶二郎¹,
有田 (森岡) 健一¹, 小島 寛², 田中 芳彦¹

¹福歯大 機能生物 感染生物

²福歯大 成長発達 障害歯

ヒトの常在真菌の一種である *Candida albicans* (*C. albicans*) は、口腔真菌感染症の原因菌として最も検出される頻度が高く、日本国内の超高齢化が進む中で免疫機能の低下と相まって注目を集める菌である。*C. albicans* はこれまで、IL-17 を産生することを特徴とするヘルパー T 細胞 Th17 との関連が多く報告されており、Th17 細胞欠損マウスでは口腔カンジダ症が重篤化することが知られているが、その制御機構については未だに不明な点が多い。口腔真菌症の治療法としては、現在は薬物療法が主体であるが抗真菌薬の種類は非常に少なく、耐性化による再発の問題もあり、新しい予防・治療法の開発が望まれている。今回、我々は全ゲノム配列の判明している *C. albicans* SC5314 株を対象とし、ヘルパー T 細胞の免疫応答を引き起こす抗原を探索する過程で、IL-17 を産生するヘルパー T 細胞を誘導する可能性のある菌体構成成分を見い出した。方法としては、野生型マウス (C57BL/6) 骨髄細胞由来の樹状細胞を抗原提示細胞とし、*C. albicans* を抗原として使用した。*C. albicans* は環境に依存して酵母形あるいは菌糸形を示すため、両者について菌体成分を比較評価した。これらの刺激によって野生型マウスから単離した T 細胞を *in vitro* で分化誘導させ、フローサイトメーターにより細胞内サイトカイン染色にて解析したところ、特定の菌体構成成分に Th17 細胞への高い誘導能が示された。本演題では、生体における *C. albicans* 菌体によるヘルパー T 細胞の分化誘導について議論する予定である。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Induction of T cell response in the regulation for oral candidiasis

○Tasaki S^{1,2}, Cho T¹, Nagao J¹, Narita Y¹, Hashimoto M¹, Ikezaki S¹, Arita-Morioka K¹,
Kojima H², Tanaka Y¹

¹Div Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll

²Div Dent Disabled, Dept Oral Growth Dev, Fukuoka Dent Coll

Candida albicans, a commensal fungus of the normal flora of the oral cavity, causes oral candidiasis in humans with localized or systemic immune deficiencies. The increasing incidence of resistance to antifungal drugs and an inherent drug tolerance of some fungi cause major obstacles to an efficient treatment. This situation evokes an urgent need for the development of novel therapeutic approaches against fungal infections. T helper cells play a critical role in oral candidiasis control. However, specific antigen determining the activation and function of antifungal T helper cells remain largely unknown. The aim of this study was to investigate the mechanism for induction of T cell for *C. albicans*. CD4⁺ T cells isolated from lymph nodes of wild type mice (C57BL/6) were stimulated with bone marrow-derived dendritic cells and *C. albicans* components. We found that some *C. albicans* components induced Th17 differentiation. We hope to discuss about the induction of T cell response in the regulation for oral candidiasis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-100 歯周病原菌に対する新規化合物の効果

○藤原奈津美^{1,2}, 村上 圭史¹, 湯本 浩通³, 弘田 克彦¹, 尾崎 和美², 三宅洋一郎¹

¹徳大 院医歯薬 口腔微生物

²徳大 院医歯薬 口腔保健支援

³徳大 院医歯薬 保存

【目的】歯周病原菌は、歯周病のみならず口臭や全身疾患などにも関連しているため、それらは有効な治療標的になりうる。口腔における汎用消毒薬の使用は、ヒト細胞や常在細菌叢への影響などに様々な問題点がある。そこで本研究では新規化合物(NCs)を合成し、それらの歯周病原菌を含めた種々の細菌に対する効果を検討した。【材料と方法】14種のNCsを合成し、それらの抗菌活性、抗バイオフィーム効果および細胞毒性を検討した。抗菌活性評価は、微量液体希釈法により、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌(MRSA・MSSA)、カンジダ、う蝕原因菌(*Streptococcus mutans*)、歯周病原菌(*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)に対してMICを測定した。抗バイオフィーム効果は、NCs存在下で96ウェルプレートに形成させた*F. nucleatum*のバイオフィームを用いてBiofilm formation assayにより評価した。さらに細胞毒性は、歯肉上皮細胞であるRT-7にNCsを24時間作用させ、培養上清中の乳酸脱水素酵素(LDH)の産生量を測定した。【結果および考察】ほとんどのNCsは、一般病原菌に対して抗菌効果を示さなかったが、歯周病原菌(*F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*)に対して抗菌活性を示した。また*F. nucleatum*のバイオフィーム形成に対し、いくつかのNCsがバイオフィーム形成抑制能を示した。さらに、NCsの多くが、汎用消毒薬であるクロルヘキシジンや塩化セシルピリジニウムに比べて低い細胞毒性を示した。以上より、NCsは常在細菌叢への影響が少なく、歯周病予防のための薬物としての臨床応用につながる可能性が示唆された。(共同研究者:中尾 允泰, 佐野 茂樹)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of novel compounds on periodontopathic bacteria

○Fujiwara N^{1,2}, Murakami K¹, Yumoto H³, Hirota K¹, Ozaki K², Miyake Y¹

¹Dept Oral Microbiol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

²Dept Oral Health Care Promo, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

³Dept Conserv Dent, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

Aim: Periodontopathic bacteria are associated with halitosis and systemic disease as well as periodontitis and therefore can be a therapeutic target. Commercial disinfectants have problems, because of its cytotoxicity and adverse effect to commensal bacteria. In this study, we synthesized novel compounds (NCs) and investigated their effects on periodontopathic bacteria. **Materials and Methods:** We synthesized 14 NCs, which were investigated for its antimicrobial effect, inhibition of biofilm formation and cytotoxicity against human keratinocytes. We evaluated the antimicrobial effect of NCs by minimum inhibitory concentration against general pathogenic bacteria, cariogenic bacteria, and periodontopathic bacteria. We further examined the biofilm formation of *Fusobacterium nucleatum* with or without NCs by biofilm formation assay. The LDH levels released from human keratinocytes, RT-7 cells, were measured after treatment with NCs. **Results and Discussion:** Most NCs have antimicrobial effects against periodontopathic bacteria, but not against general pathogenic bacteria. Moreover, most of NCs significantly inhibited biofilm formation. Cytotoxicity of most NCs was lower than that of chlorhexidine and cetylpyridinium chloride. **Conclusion:** In this study, we demonstrated that NCs is effective against periodontopathic bacteria. Our results suggested that NCs can be applied for the prevention of periodontitis without affecting commensal bacteria.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-101 マクロファージ分化における ω -3 系脂肪酸の役割

○川野 亜希^{1,2}, 沖永 敏則², 引地 尚子¹, 有吉 渉², 西原 達次²

¹九歯大 口腔保健管理

²九歯大 感染分子生物

【目的】マクロファージは、大きく2つの表現型 (M1/M2) に分類される。その1つである M2 マクロファージは、組織修復や腫瘍組織における血管新生促進, M1 マクロファージ拮抗作用といった働きがあり、さらに抗炎症機能活性に関与していると報告されている。近年、 ω -3 系脂肪酸の抗炎症効果が注目されているが、そのメカニズムは十分解明されていない。そこで本研究では、 ω -3 系脂肪酸の抗炎症効果と M2 マクロファージの抗炎症機能活性に注目し、マクロファージの M1/M2 分化過程における ω -3 系脂肪酸の影響を検証した。

【方法】細胞はヒト単球-マクロファージ系細胞 THP-1 および U937 細胞を使用した。今回は phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 未処理群・処理群を設定した。M2 マクロファージへの分化誘導因子として IL-4 を使用し、 ω -3 系脂肪酸として Docosahexaenoic acid (DHA) を使用した。M2 マクロファージ分化マーカーの遺伝子発現は real-time RT-PCR, タンパク質発現は Western blotting, 表面抗原発現に関してはフローサイトメーターを用いて解析した。

【結果】PMA 処理後の THP-1 および U937 細胞において、IL-4 添加により、M2 マーカーの遺伝子ならびにタンパク発現上昇を認めた。一方で、DHA 添加では PMA の処理に関わらず M2 マーカーのタンパク発現上昇を認めた。また、フローサイトメーターにて、IL-4 および DHA 添加において M2 マーカーである表面抗原の発現を認めた。

【考察】THP-1 ならびに U937 細胞において、IL-4 と DHA が M2 マーカーの発現を誘導することが明らかとなった。また、PMA 未処理・処理に関わらず、タンパクおよび表面抗原の発現解析において、DHA が M2 マーカーの発現を誘導することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The roles of omega-3 fatty acid in the macrophage differentiation

○Kawano A^{1,2}, Okinaga T², Hikiji H¹, Ariyoshi W², Nishihara T²

¹Dept Oral Health Manage, Kyushu Dent Univ

²Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ

Objective: Macrophages are divided into at least two main phenotypes known as M1 and M2. M2 macrophages play roles in anti-inflammatory reactions and tissue remodeling. Omega-3 polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic acid (DHA) are essential fatty acids. Recently, it is reported that DHA has the anti-inflammatory activities, however, it is unknown how DHA regulates anti-inflammatory activities of macrophages on the molecular level. In the present study, we investigated the effects of DHA on the differentiation of macrophages.

Methods: THP-1 cells and U937 cells were seeded in RPMI1640 containing 5% FBS and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) respectively. The cells were cultured overnight, and then washed with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.0) to remove PMA, and then incubated with IL-4 or DHA for the indicated times. The expression of M2 markers was examined by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), western blot analysis, and flow cytometry.

Results: IL-4 and DHA increased the expression of M2-surface antigens in PMA-treated THP-1 cells and U937 cells. Furthermore, DHA, but not IL-4, increased the expression of these antigens even in cells untreated with PMA.

Conclusion: DHA promotes M2-polarization in THP-1 cells and U937 cells. DHA may have the anti-inflammatory activities through M2-polarization.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-102 *Streptococcus sanguinis* の IL-1 α 産生誘導活性におけるインフラマソームの関与

○佐伯 歩¹, 長谷部 晃¹, 亀崎 良助¹, 鈴木 敏彦², 柴田健一郎¹

¹北大 院歯 口腔分子微生物

²医科歯科大 院医歯 細菌感染

Streptococcus sanguinis (Ss) は、感染性心内膜炎の代表的起因菌として注目されており、その病態の形成に IL-1 が関与していることが報告されている。IL-1 は IL-1 α ならびに IL-1 β からなり、これまで、我々は Ss がマウス樹状細胞ならびにマクロファージにおいて NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 β の産生を誘導することを報告した。そこで、本研究では、Ss の IL-1 α 産生誘導活性について検証した。菌株は *S. sanguinis* ATCC 10556 を用いた。標的細胞として A/J マウス由来樹状細胞 (XS-106 細胞)、さらに、C57BL/6 (B6) マウスならびに caspase-1, ASC あるいは NLRP3 をノックアウトしたマウスより採取した骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ (BMM) を用いた。IL-1 α の産生は ELISA 法ならびに Western blot 法で測定した。Ss は XS-106 細胞ならびに B6 由来の BMM に IL-1 α の産生を誘導し、caspase-1, NLRP3 ならびに ASC をノックアウトすることにより有意に減弱した。また、本活性は calpain 阻害剤である MDL 28170 により阻害されたが、caspase-1 阻害剤である z-YVAD-FMK では阻害されなかった。さらに、Proximity ligation assay により IL-1 α と caspase-1 が細胞質で共局在することが観察された。これらの結果から、Ss は BMM に対して IL-1 α 産生を誘導する活性を有し、その活性発現には NLRP3 インフラマソームが関与していることが示唆された。しかしながら、NLRP3 インフラマソームの活性化で誘導される caspase-1 のタンパク質分解活性が重要ではなく、caspase-1 と IL-1 α が細胞質で共局在していることが何か重要な役割を果たしているのではないかと推測された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Involvement of inflammasome in IL-1 α -inducing activity of *Streptococcus sanguinis*

○Saeki A¹, Hasebe A¹, Kamezaki R¹, Suzuki T², Shibata K¹

¹Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

²Div Bacter Pathogenesis, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Streptococcus sanguinis (Ss), a human oral inhabitant, is one of the most potent agents of infective endocarditis (IE). Recently, the proinflammatory cytokine IL-1 consisting of IL-1 α and IL-1 β has been shown to contribute to the onset of IE. Recently, we showed that Ss activates the NLRP3 inflammasome to produce IL-1 β in murine dendritic cells and macrophages. Therefore, this study was designed to examine whether Ss has the activity to induce IL-1 α production by these cells. The murine dendritic cell line XS106 and bone marrow-derived macrophages (BMMs) from C57BL/6 (B6), NLRP3-, ASC- and caspase-1-deficient mice were used. IL-1 α secreted was measured by ELISA and Western blotting. Ss had the activity to induce secretion of IL-1 α by XS106 and BMMs from B6 in a dose-dependent manner, but the activity toward NLRP3-, ASC- and caspase-1-deficient BMMs were significantly attenuated. The calpain-1 inhibitor MDL28170 but not the caspase 1 inhibitor z-YVAD-fmk attenuated the IL-1 α -inducing activity. Colocalization of caspase-1 with IL-1 α was detected by Proximity ligation assay. Thus, this study suggests that the NLRP3 inflammasome is involved in the IL-1 α -inducing activity of Ss, which might be mediated by the colocalization of caspase-1 and IL-1 α in cytosol but not by the proteolytic activity of caspase-1.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-103 A 群レンサ球菌の PI3K/Akt 活性化因子を介した咽頭上皮細胞株への付着・侵入メカニズムの解析

○黒澤 美絵^{1,2}, 小田 真隆¹, 土門 久哲¹, 齊藤 一誠², 早崎 治明², 寺尾 豊¹

¹新潟大 院医歯 微生物

²新潟大 院医歯 小児歯

A 群レンサ球菌は、細菌性咽頭炎の主たる起因菌として知られている。同菌の産生する病原因子群は、上皮細胞への侵入および組織内増殖を惹起することで感染を拡大させると考えられている。A 群レンサ球菌が産生する CAMP factor に着目して解析を進めたところ、マクロファージ系細胞に対して空胞形成を誘導すること、また貪食能を低下させることが明らかとなった。本研究では、A 群レンサ球菌の咽頭上皮細胞株への付着・侵入に対する CAMP factor の影響について解析した。はじめに、A 群レンサ球菌 SSI-9 株の CAMP factor 遺伝子欠失株 (Δcfa 株) を作製し、ヒト咽頭癌由来 Detroit562 細胞に 2 時間感染させた。 Δcfa 株は野生株と比較して、血清非存在下における細胞への付着・侵入菌数が有意に少なかった。また、Detroit562 細胞に組換え (r) CAMP factor を 1 時間作用させた後、 Δcfa 株を 2 時間感染させたところ、 Δcfa 株の細胞への付着・侵入数は rCAMP factor 添加濃度依存的に増加した。次に、エンドサイトーシスに着目し、PI3K/Akt 経路と CAMP factor との関係について調べた。その結果、 Δcfa 株感染細胞内の PI3K の活性化および Akt リン酸化はほとんど認められなかった。しかしながら、野生株を感染、もしくは CAMP factor を単独で作用させた細胞では、PI3K の活性化および Akt のリン酸化が観察された。さらに、CAMP factor 処理で亢進した Δcfa 株の付着・侵入は、PI3K 阻害剤および Akt 阻害剤の添加により抑制された。次に、Detroit562 細胞に si PI3K を遺伝子導入し、PI3K ノックダウン細胞を作製した。PI3K ノックダウン細胞ではコントロールの細胞に比べ、A 群レンサ球菌の付着・侵入数が有意に少なかった。したがって、A 群レンサ球菌の咽頭上皮細胞への付着・侵入は、同菌の CAMP factor による宿主細胞内 PI3K/Akt 経路の活性化により惹起されると推察した。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Molecular analyses of CAMP factor and PI3K/Akt signaling pathway on adhesion and invasion of *Streptococcus pyogenes* to human pharyngeal epithelial cells

○Kurosawa M^{1,2}, Oda M¹, Domon H¹, Saitoh I², Hayasaki H², Terao Y¹

¹Div Microbiol Infect Dis, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Div Pediatr Dent, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Purpose: *Streptococcus pyogenes* causes human pharyngitis. *S. pyogenes* produces molecules that lead to invasion and bacterial growth in tissues. The aim of this study is to investigate the effects of CAMP factor on invasion of *S. pyogenes* to human pharyngeal epithelial cells.

Materials & Methods: Human pharyngeal epithelial cell lines Detroit562 or the PI3K knockdown cells were incubated with recombinant (r) CAMP factor, and infected with *S. pyogenes* strain SSI-9 or the isogenic *cfa*-deficient (Δcfa) mutant, and colony counting assay were performed. Next, Detroit562 cells were incubated with strain SSI-9 or Δcfa strain, or rCAMP factor. The proteins in cell lysates were analyzed by Western blotting using the anti-phospho-Akt antibody.

Results & Discussion: The number of invaded Δcfa strain was significantly less than that of strain SSI-9. And the streptococcal internalization into epithelial cells was promoted in the presence of rCAMP factor. In addition, rCAMP factor and *S. pyogenes* strain SSI-9 activated Akt in Detroit562 cells. In the PI3K knockdown cells, the number of invaded *S. pyogenes* was significantly less than in control cells. These results suggested that *S. pyogenes* CAMP factor induced the activation of PI3K/Akt signaling pathway in epithelial cells followed by streptococcal invasion.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-104 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DNA によるインフラマソームの活性化

○亀崎 良助^{1,2}, 佐伯 歩¹, 長谷部 晃¹, 北川 善政², 鈴木 敏彦³, 柴田健一郎¹

¹北大 院歯 口腔分子微生物

²北大 院歯 口腔診断内科

³医科歯科大 院医歯 細菌感染

インフラマソームは多様な生理活性をもつ炎症性サイトカインのひとつである IL-1 β の産生を制御する細胞内センサーである。近年、IL-1 β は歯周炎を含む多くの炎症性疾患において重要な病的役割を果たしている。そこで、本研究では、侵襲性歯周炎の主な病原菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の歯周疾患における病因論の一部を明らかにすることを目的とし、本菌によるインフラマソームの活性化について検証した。*Actinomycetemcomitans* JP2 (Aa) (北海道医療大学歯学部長澤 敏行先生より分与) の生菌および 100°C で 5 分間熱処理した死菌を用いた。C57BL/6 (b6) マウスならびに caspase-1, ASC, あるいは NLRP3 をノックアウトしたマウスより採取した骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ (BMM) を用いた。生菌ならびに死菌で B6 由来 BMM を刺激したところ、生菌、死菌ともに IL-1 β の産生を誘導したが、死菌の活性が約 10 倍高いことが分かった。生菌および死菌の活性は caspase-1, ASC, NLRP3 のそれぞれをノックアウトした BMM では共に有意に減弱した。死菌の活性は DNase 処理で有意に減弱し、また、熱処理後の上清に DNA が遊離していた。そこで、DNA を抽出し、B6 由来 BMM を刺激したところ、濃度依存的に IL-1 β の産生を誘導した。また、この IL-1 β の産生誘導活性は、caspase-1, ASC, NLRP3 のそれぞれをノックアウトした BMM では有意に減弱していた。以上の結果から、Aa は NLRP3 インフラマソームを活性化して IL-1 β の産生を誘導しており、その誘導活性物質の一つは DNA であることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Activation of inflammasome by genomic DNA of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

○Kamezaki R^{1,2}, Saeki A¹, Hasebe A¹, Kitagawa Y², Suzuki T³, Shibata K¹

¹Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

²Dept Oral Diagn Med, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

³Div Bacter Pathogenesis, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Inflammasome is an intracellular sensor that regulates the production of IL-1 β , which is one of the inflammatory cytokine with diverse biological activities. IL-1 β plays important pathological roles in many inflammatory diseases including periodontitis. In this study, we investigated whether *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a major pathogen of aggressive periodontitis, induces the activation of inflammasome in macrophages to produce IL-1 β . Live or heat-killed (100 degrees, 5 min) cells of *A. actinomycetemcomitans* JP2 (Aa) was used. Bone marrow-derived macrophages (BMMs) from C57BL/6 (B6), caspase-1⁻, ASC⁻, and NLRP3-deficient mice were used. Live and heat-killed cells of Aa have the activity to induce IL-1 β production by B6-derived BMMs. The activity of heat-killed cells is almost 10-fold higher than that of live cells. The activities of both live and heat-killed cells were significantly attenuated in BMMs from caspase-1⁻, ASC⁻ and NLRP3-deficient mice. The activity of heat-killed cells was significantly inhibited by DNase treatment and it was found that genomic DNA from live cells of Aa induced IL-1 β production by B6-BMMs in a dose dependent manner and the activity was depend on the NLRP3 inflammasome. Thus, these results suggest that Aa activates NLRP3 inflammasome in murine BMMs to produce IL-1 β , and one of active entities is its genomic DNA.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-105 タイ児童舌苔から分離された *Veillonella* 属新菌種の塩基配列解析

○眞島いづみ^{1,2}, Theodora Citra², 中澤 太²

¹学振 特別研究員 PD

²北医療大 歯 微生物

【目的】 *Veillonella* 属細菌は口腔バイオフィルム初期形成菌として、ヒト口腔から多く分離されることが報告されている。口腔 *Veillonella* は現在、*V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae*, *V. tobetuensis* の全 6 菌種が確立されている。これまでの研究過程で、我々は *Veillonella* 属特異的 PCR プライマー陽性で (*Veillonella* 属細菌で) あるが、上記 6 菌種の特異的プライマーでは陰性 (既存の *Veillonella* 6 菌種には分類されない) の 40 株をタイ児童舌苔から分離した。本研究ではその中の代表的 11 株の *rpo B* 遺伝子のシーケンス解析を行ったので、その結果を報告する。【材料と方法】 Rogosa 選択培地にて嫌気培養した 11 株から DNA を抽出し、*Veillonella* 属特異的プライマーを用いた PCR 産物の塩基配列を、Dye Terminator 法により ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて解析した。得られた塩基配列について BLAST 検索、未同定株間及び既報菌種との類似性比較、系統樹解析を行った。【結果と考察】 BLAST 検索の結果、11 株は *V. dispar* に最も近縁であったが、その塩基配列の類似性は 97 - 98% を示し、E-value は 0.0 - 4e-168 と高値であった。更に、系統樹解析において、これら 11 株は既報菌種とは全く異なるクラスターを形成し、それらの類似性は 92.4 - 100% であった。これらの結果より、これまで報告されていない *Veillonella* 属新菌種の存在が強く示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The sequence analysis of the novel *Veillonella* species isolated from tongue biofilm of Thai children

○Mashima I^{1,2}, Theodora C², Nakazawa F²

¹Postdoc Research Fellowship for Young Scientists JSPS

²Div Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Purpose: Oral *Veillonella* is comprised of the following species: *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae* and *V. tobetsuensis*. In our previous studies, 40 strains were isolated from tongue biofilm of Thai children as unknown *Veillonella* species. Although they made PCR products with *Veillonella* genus-specific primers, they made no PCR products or non-specific one with *Veillonella* species-specific primers. In this study, the results of sequence analysis of *rpo B* gene against 11 representative strains indicated the possibility of novel *Veillonella* species. **Materials & Methods:** PCR-based amplification and sequence analyses of *rpo B* were performed using previously described *Veillonella* genus-specific primers. The sequences were determined with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. BLAST search, pairwise similarity values and constructing phylogenetic tree were examined. **Results and Discussion:** As the results of BLAST search, the sequences of 11 strains showed 97- 98% similarities with *V. dispar*, and the high E-value between 0.0 and 4e-168. In addition, the 11 strains formed a distinct cluster from the established oral *Veillonella* species in the *rpo B* tree, and showed 92.4 - 100% inter-strain sequence similarities. These results strongly indicated the possibility of novel species in the genus *Veillonella* within the 11 strains.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-106 *Candida albicans* のバイオフィーム形成における mild heat stress の影響

○池崎晶二郎¹, 長 環¹, 田崎 園子¹, 橋本麻利江¹, 成田 由香¹, 永尾 潤一¹,
有田 (森岡) 健一¹, 池邊 哲郎², 田中 芳彦¹

¹福歯大 機能生物 感染生物

²福歯大 口外

ヒトの皮膚・粘膜に常在する *Candida albicans* は、インプラントやカテーテル等の体内留置医療器具に親和性を示しバイオフィームを形成しやすく、集中治療時や要介護時に日和見感染症を起こすハイリスク真菌である。我々はこれまでに *C. albicans* のバイオフィーム形成に対し、発熱や温熱療法のような外部からの熱刺激を想定した 39°C (mild heat stress) 下で作用点の異なる 3 つの抗真菌薬の効果を比較検討した。中でも細胞壁合成酵素阻害薬に対して 39°C の温度効果により作用濃度を引き下げることができた (Cho T et al. 2012)。この結果は抗真菌薬投与時に mild heat stress を利用することでより効果的な薬剤治療を行える可能性を示唆している。今回 *C. albicans* SC5314 株を用いて 37°C と 39°C 下でバイオフィームを形成させ、マイクロアレイ法によるその遺伝子発現を網羅的に解析し、幾つかの興味深い遺伝子に関してさらに分子生物学的解析を行ったので報告する。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effects of mild heat stress on biofilm formation of *Candida albicans*

○Ikezaki S¹, Cho T¹, Tasaki S¹, Hashimoto M¹, Narita Y¹, Nagao J¹, Arita-Morioka K¹,
Ikebe T², Tanaka Y¹

¹Div Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll

²Div Oral Surg, Fukuoka Dent Coll

Candida albicans is a commensal of human mucosal surfaces. However, the organism can form biofilms on medical implants and intravascular catheters resulting in biofilm-related infections and systemic candidiasis. Exogenous mild heat stress has been widely used as a physical therapy for treatment of muscle injury and malignant tumors. On the other hand, endogenous mild heat stress (fever at around 39°C) that occurs during bacterial infections induced optimized cytokine expression and pathogen elimination. We tested *in vitro* efficacy of continuous mild heat stress on the antifungal susceptibility of this organism biofilm formation (Cho T et al. 2012). The results suggested that mild heat stress would be valuable for increasing the effectiveness of low concentration of antifungal agents against *C. albicans* biofilm formation. Here, the transcription profiles in *C. albicans* biofilms undergoing their responses to changes in temperature were tested. We present a global transcriptional analysis of *C. albicans* response to mild heat stress.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-107 侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼの酵素反応の解析

○安部 佐, 河原井武人, 高橋 幸裕, 古西 清司

日歯大 生命歯 微生物

【目的】我々は侵襲性歯周炎原因菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* を用いた解析から, 呼吸鎖のキノールを電子供与体とし, 過酸化水素 (H_2O_2) を代謝する膜結合性キノールペルオキシダーゼ (QPO) を見出した. 本酵素は, ハウスキーピング酵素として捉えられ, また病原因子としても考えられる. 特に欠損変異株では, 病原因子 LtxA の分泌が抑制されることを示した. QPO はユビキノール-1 (Q_1H_2) と H_2O_2 を基質とし, ユビキノール-1 と水を産生する反応を触媒する. 現在まで, 我々は QPO の精製・クローニングを行い, 大腸菌でのリコンビナント QPO (rQPO) の過剰発現系を確立した. QPO は3つのヘムを有しており, N末端の1回膜貫通領域で内膜に結合している. 本報告では, QPO の動力学定数を決定し, 不可逆的タンパク阻害剤としても考えられる H_2O_2 の高濃度における阻害様式を動力学的手法により解析し, QPO の分子レベルでの反応様式を検討した. 【試料と方法】試料として rQPO を用いた. rQPO は本菌の *qpo* をクローン化した大腸菌に過剰発現させ, その膜画分から抽出・精製することにより調製した. 各種濃度での Q_1H_2 と H_2O_2 を基質としてペルオキシダーゼ活性を分光学的に測定した. 【結果と結論】精製 rQPO の動力学解析を行った結果, Q_1H_2 と H_2O_2 の K_m はそれぞれ $111 \mu M$ と $6.17 \mu M$ であった. QPO の高濃度 H_2O_2 による酵素失活反応は擬一次的であり, H_2O_2 と K_{obs} は比例関係にあった. また, 変数基質を Q_1H_2 と H_2O_2 とした生成物による阻害様式はそれぞれ noncompetitive と competitive であった. 以上より, QPO の酵素反応は Ping Pong Bi Bi 機構であることが示された.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Enzymatic properties of quinol peroxidase of aggressive periodontopathic bacterium

○Abe T, Kawarai T, Takahashi Y, Konishi K

Dept Microbiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Objectives: Quinol peroxidase (QPO) catalyzes peroxidation using quinol as electron donor in respiratory chain of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, an oral pathogen causing aggressive periodontitis. QPO is recognized as housekeeping enzyme, and virulence factor. Deletion mutation restrained secretion of LtxA. QPO produces ubiquinol-1 and water using ubiquinol-1 (Q_1H_2) and H_2O_2 as substrates. We established overexpression of recombinant QPO (rQPO) in *Escherichia coli*. Here, kinetic constants of QPO was reported, and higher concentration of H_2O_2 caused irreversible inhibition. We also analyzed the enzymatic mechanism of QPO. **Materials and Methods:** Overexpressed, purified rQPO in membrane fraction of *E. coli* harboring the plasmids containing *qpo* from *A. actinomycetemcomitans*. Activity of QPO was measured in the presence of saturated Q_1H_2 or H_2O_2 and varying concentrations of another substrate, using a spectrophotometer. **Results and Conclusion:** The kinetic analysis of purified rQPO characterized kinetic constants using Q_1H_2 and H_2O_2 as substrates ($K_m = 111 \mu M$ and $6.17 \mu M$, respectively). Reaction of irreversible QPO inactivation by H_2O_2 was pseudo-first-order. K_{obs} is proportion to H_2O_2 . Inhibition data indicated noncompetitive and competitive when Q_1H_2 and H_2O_2 were used as varied substrates, respectively. Thus, we showed enzymatic property of QPO was explained by Ping Pong Bi Bi mechanism.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-108 タイ児童の口腔清掃状態と唾液中のベイオネラ属細菌種の分布と出現頻度

○Theodorea Citra^{1,2}, 眞島いづみ^{1,3}, 中澤 太¹

¹北医療大 歯 微生物

²インドネシア大 歯 口腔生物

³学振 特別研究員 PD

The distribution and frequency of oral *Veillonella* species in saliva from Thai children associated with oral hygiene status

○Theodorea C^{1,2}, Mashima I^{1,3}, Nakazawa F¹

¹Div Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

²Dept Oral Biol, Indonesia Univ Fac Dent

³Postdoc Research Fellowship for Young Scientists JSPS

Background: Oral hygiene has influence in the microbial profile and diversity of oral biofilms. Oral *Veillonella* species were known as early colonizer in the biofilm formation. However, the distribution and frequency of oral *Veillonella* species associated with oral hygiene status has not been clarified. **Aim:** Distribution and frequency of oral *Veillonella* species in the saliva from the Thai children associated with oral hygiene status were evaluated in this study. **Methods:** 46 subjects were classified by using *Simplified Oral Hygiene Index* (OHI-S) into three groups. PCR with species-specific primer sets were used for identification. **Results:** The total number of *Veillonella* isolates in poor OHI-S group had twice higher than that in good OHI-S group. *V. rogosae* was detected as predominant species in all groups. Otherwise, *V. denticariosi* was detected at low frequency in every group. In addition, *V. parvula* was detected in poor OHI-S group, mainly, and *V. tobetsuensis* was only detected in moderate and poor OHI-S group. **Conclusion:** Based on these results, the total number of *Veillonella* species in the saliva might have related with oral hygiene status. Moreover, the presence of *V. parvula* and *V. tobetsuensis* might have associated with deterioration of oral hygiene status in Thai children.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-109 マウス唾液腺樹状細胞の同定とその免疫学的特徴の解析

○陸 路^{1,2}, 田中 志典^{2,3}, 菅原 俊二²

¹東北大 院歯 口診

²東北大 院歯 口腔分子制御

³東北大 院歯 小児歯

【目的】口腔や腸管などの各粘膜免疫系が相互作用することにより構築される全身の粘膜免疫システムは共通粘膜免疫システムと呼ばれている。唾液腺も分泌型 IgA を産生することなどにより、口腔領域における共通粘膜免疫システムの一翼を担っている。唾液腺には多様な免疫担当細胞が存在するが、抗原提示細胞、特に樹状細胞は同定されていない。本研究は、唾液腺樹状細胞を同定し、その分化・成熟経路と免疫学的特徴について解析することを目的とした。【方法】マウス顎下腺から酵素処理により浮遊細胞を調製し、フローサイトメトリー解析を行った。また、樹状細胞特異的増殖因子である Flt3 ligand (Flt3L) により誘導される細胞増殖と樹状細胞共通前駆細胞 (common dendritic cell precursor, CDP) 移入試験により、唾液腺樹状細胞の分化・成熟経路を解析した。さらに、卵白アルブミン特異的 OT-I ナイーブ CD8⁺T 細胞と抗原提示細胞を共培養することにより、クロスプレゼンテーション能を解析した。【結果】顎下腺細胞のフローサイトメトリー解析から、CD45⁺ MHC class II⁺ CD64⁺マクロファージと CD45⁺ MHC class II⁺ CD11c⁺樹状細胞の2種類の抗原提示細胞が同定され、唾液腺樹状細胞は CD103⁺と CD11b⁺に分類された。また、唾液腺樹状細胞は Flt3L 依存性に増殖し、CDP より分化することが明らかになった。さらに、CD103⁺唾液腺樹状細胞はクロスプレゼンテーション能を持つことが明らかとなった。【考察】本研究の結果から、マウス顎下腺には少なくとも2種類の樹状細胞が常在しており、唾液腺における免疫応答の制御に関与していることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Identification and characterization of dendritic cells in murine salivary glands

○Lu L^{1,2}, Tanaka Y^{2,3}, Sugawara S²

¹Div Oral Diag, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Div Oral Immunol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

³Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Purpose: Various immunocompetent cells reside in salivary glands. However, it is still unclear whether antigen-presenting cells (APCs), especially dendritic cells (DCs), reside in salivary glands or not. In this study, we attempted to identify and characterize the DCs in murine submandibular gland (SMG). **Methods:** Single cell suspensions were prepared from murine SMG by enzymatic digestion and analyzed by flow cytometry. Proliferation and origin of APCs were analyzed by Flt3 ligand (Flt3L)-induced proliferation assay and common dendritic cell precursor (CDP) transfer assay. Flt3L is a specific growth factor for DCs. For *in vitro* cross-presentation assay, ovalbumin-pulsed APCs were co-cultured with ovalbumin-specific OT-I naïve CD8⁺T cells. **Results:** Flow cytometric analysis revealed that there are two kinds of SMG APCs, CD45⁺ MHC class II⁺ CD64⁺ macrophages and CD45⁺ MHC class II⁺ CD11c⁺ DCs. SMG DCs were further classified into CD103⁺ and CD11b⁺. SMG DCs proliferated dependently on Flt3L and were derived from CDP. CD103⁺ SMG DCs showed cross-presentation activity. **Conclusion:** We identified at least two kinds of SMG DCs, CD103⁺ and CD11b⁺. These results indicated that the DCs may contribute immune responses in salivary glands.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-110 乳幼児期における口腔常在細菌叢の変化と影響を与える要因の検討

○朝川美加李, 竹下 徹, 影山 伸哉, 山下 喜久

九大 院歯 口腔予防

【目的】ヒトの常在細菌叢の形成は無菌状態で誕生した新生児の口腔への特定の細菌種の定着に始まり、幼児期に一定の細菌叢が成立した後は成長に伴い徐々に変化していくと考えられている。腸管細菌叢の成熟過程については数多くの報告があるが、菌の萌出など特有の現象が生じる口腔の細菌叢については未だ不明な点が多い。本研究では、乳幼児期における口腔細菌叢の成熟過程とそれに影響を与える要因について検討した。

【方法】生後3~4か月の乳児6名を対象とし、週一回程度の間隔でおよそ2年間舌苔を採取した。採取した舌苔検体からDNAを抽出し、細菌共通配列であるプライマーを用いて16S rRNA領域(V1-V2領域)の遺伝子を網羅的に増幅した。増幅断片の塩基配列を次世代シーケンサー Ion PGM (Thermo Fisher scientific 社)を用いて解読し、塩基配列情報を基にそれぞれの検体の細菌構成を明らかにした。

【結果】各被験者の舌苔の細菌構成を菌属レベルで比較すると、初期の舌苔では主に *Streptococcus*, *Rothia* の2菌属が構成の大部分を占めており、その傾向は特に母乳を主として育てられた乳児で顕著に認められた。その後、離乳食への移行に伴って、*Neisseria*, *Porphyromonas*, *Granulicatella* などのその他の口腔常在細菌が占める割合が増加し、検出される菌種の多様化が認められた。検出 OTU (菌種) 数をはじめとする alpha-diversity 指標は採取当初から時間経過とともに徐々に増加し続けるが、どの被験者でも生後400日程度で頭打ちになり、その後は一定化する傾向が認められた。

【結論】本研究によって乳幼児期に見られる口腔細菌叢の成熟過程が明らかになるとともに、授乳形態や離乳食の導入といった対象児の食形態の変化が関与していることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Development of oral indigenous microbiota and factors associated with its maturation in early childhood

○Asakawa M, Takeshita T, Kageyama S, Yamashita Y

Sect Prevent Dent Public Health, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Objective: Microorganisms inhabit in human oral cavity from birth and constitute a stable indigenous microbiota. However, an assembly process of the complex microbiota during early childhood remains unclear. We investigated temporal shift of bacterial community structure of tongue coating and explored factors associated with its maturation.

Materials and Methods: Tongue coating samples were collected from 6 infants from 3 months to 2 years of age once a week. Bacterial DNA was extracted from each sample, and the V1-V2 region of the 16S rRNA genes was amplified with universal primers 8F and 338R. DNA sequencing was determined a next generation sequencer, Ion PGM (Thermo Fisher scientific).

Results: The tongue microbiota of breast- or bottle-feeding infants was mostly constituted by *Streptococcus* and *Rothia* species. These bacteria were more predominant in breast-fed infants comparing with bottle-fed infants. The microbiota gradually altered after starting baby food and the relative abundances of *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Granulicatella* species increased in the tongue microbiota. Alpha-diversity indices such as number of identified OTU gradually increased and reached a plateau at about 400 days after birth.

Conclusion: This study identified the temporal shift of tongue microbiota during early childhood and factors associated with its maturation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-111 唾液マイクロバイームは歯周病の重症度を反映する

○影山 伸哉, 竹下 徹, 朝川美加李, 柴田 幸江, 山下 喜久

九大 院歯 口腔予防

【目的】唾液は舌苔やプラークと常に接しており、唾液にはそれらの部位から剥離した様々な細菌が含まれていると考えられる。しかし、これまでの多くの研究では唾液中の細菌構成は舌苔と非常に類似すると報告されており、プラーク由来の細菌についてはあまり注目されてこなかった。縁下プラークの細菌群集が歯周病と関連することはすでに知られており、唾液に含まれる縁下プラーク由来の細菌を調べることは、唾液を用いた歯周病の評価につながると考えられる。本研究では口腔の各部位の細菌構成を比較し、縁下プラークが唾液マイクロバイームに及ぼす影響について検討した。【方法】歯科医院を訪れた14名の歯周病患者から採取した、唾液、舌苔、縁上プラーク、縁下プラークよりDNAを抽出し、16S rRNA領域の遺伝子を増幅した。増幅断片の塩基配列は次世代シーケンサー Ion PGM を用いて解読し、それぞれの検体の細菌構成を明らかにした。【結果】各部位の類似度をUniFrac 距離を用いて評価すると、唾液は舌苔と類似しており、縁下プラークとは大きく異なっていた。各検体を OTU (細菌種) レベルで解析すると、いずれかの部位で平均構成比率が1%以上を占める主要な56 OTUのうち、階層的クラスタリング解析によって、red complex を含む13 OTU が縁下プラークに特徴的な「縁下細菌群」として選出された。縁下細菌群が縁下プラークにおいて占める割合は4 mm以上のポケットの割合と有意に相関していた ($r=0.70$)。縁下細菌群は縁下プラーク中だけでなく唾液中にも存在しており、唾液中の縁下細菌群の構成比率は縁下プラーク中の構成比率と有意な相関を示し ($r=0.58$)、さらに4 mm以上のポケットの割合とも有意に相関していた ($r=0.77$)。【結論】唾液マイクロバイームは全体的には舌苔と類似していたが、一部に縁下プラーク由来の細菌を含んでおり、それによって歯周病の重症度の評価が可能であることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Salivary microbiome reflects the severity of periodontitis

○Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Yamashita Y

Sect Prevent Dent Public Health, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Introduction: Saliva constantly contacts with tongue coating and plaque, and contains various bacteria in these sites. However, little attention has given to bacteria derived from subgingival plaque in saliva. In this study, we compared the bacterial composition in each oral site, and considered the effect of subgingival plaque on salivary microbiome. **Methods:** Saliva, tongue coating, supra- and subgingival plaque were collected from 14 patients with periodontitis, and their bacterial composition were investigated using 16S rRNA gene amplicon sequencing. **Results:** An analysis of similarity using UniFrac revealed that the salivary overall bacterial community was similar to tongue coating, and quite different from subgingival plaque. Of main 56 OTUs (species-level operational taxonomic units), 13 OTUs including red complex were selected as subgingival species. The relative abundance of subgingival species in subgingival plaque was significantly correlated with the ratio of pocket with ≥ 4 mm Dept h ($r=0.70$). The relative abundance of subgingival species in saliva was significantly correlated with that in subgingival plaque ($r=0.58$), and also significantly correlated with the ratio of pocket with ≥ 4 mm Dept h ($r=0.77$). **Conclusion:** The salivary microbiome is similar to tongue coating, but contains subgingival-derived bacteria and reflects the severity of periodontitis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-112 口腔粘膜炎症において局所に集積する T 細胞の解析

○Hirunwidchayarat Worawalun, 大野 建州, Kang Siwen, 永井 重徳, 東 みゆき
医科歯科大 院医歯 分子免疫

Analyses of locally recruiting T cells in the oral mucosa inflammation

○Hirunwidchayarat W, Ohno T, Kang S, Nagai S, Azuma M
Div Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Purpose: The oral mucosa is a type II mucosal surface covered by a stratified squamous epithelium, which share many features with the skin. The oral mucosa also functions as a protective barrier against harmful environmental stimuli. It has been believed that oral mucosa is more resistant to inflammatory stimuli and recovers quickly from inflammatory change as compared with the skin. However the regulatory mechanisms have not been clarified yet. In this study, we have established a murine model of hapten-induced oral mucosal inflammation and examined histological changes and recruitment of T cells in the local tissues and the secondary lymphoid tissues. **Methods:** DNFB was painted onto the shaved abdominal skin for sensitization and then 0.2% DNFB was topically applied onto the ear skin (ES) or the buccal mucosa (BM) for challenge. Histological changes in the local tissues and lymphocyte status in the ES, BM, regional lymph node (RLN), and spleens after the challenge were analyzed. **Results and Discussion:** At 10h after BM challenge, the thickened epithelium, disarrangement of basal cells, and infiltration of mononuclear cells under the epithelium were observed. At 24h, more severe damage of most epithelium layers and basement membrane with abundant infiltration was observed. Despite the severe damages of epithelium, epithelial layer started to recover at 36h and the thickness returned to the normal level at 72h. In contrast, the swelling of ES continued during 24-48 hrs. At 24h after challenge, total cell numbers in the RLN and spleens increased, however, the ratios of CD3⁺ T cells decreased and reciprocally local tissue-recruiting CD3⁺ T cells increased. They showed CD62L⁻CD44^{high} effector memory phenotype. Although tissue recruiting CD8⁺ T cells expressed much higher levels of IFN- γ , BM-recruiting CD8⁺ T cells expressed lower percentages of IFN- γ , suggesting impaired activation of CD8⁺ T cells in the BM. BM challenge induced a lower ratio of IFN- γ ⁺ splenic CD4⁺ T cells and higher ratio of Foxp3⁺ regulatory T cells in the RLN, suggesting impaired activation of CD4⁺ T cells in the BM. Our results suggest that the BM-recruiting T cells was abundant, but their activation status was regulated as compared to the skin-recruiting T cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-113 *Candida albicans* に対する口腔プロバイオティクス候補菌の有効成分の検討

○小島由佳子, 大島 朋子, 河井 智美, 前田 伸子

鶴大 菌 微生物

乳酸菌群は古来より世界中で発酵食品として広く用いられ、近年ではプロバイオティクスとして盛んに利用されている。その中には、有機有効成分を産出する菌株が存在し、病原微生物の増殖阻害として静菌的および殺菌的な効果を示すことが報告されている。しかし、多くはヒトの腸内フローラを対象とした研究や口腔におけるう蝕や歯周病原菌の増殖抑制効果であり、口腔フローラへの応用や口腔 *Candida* 症の抑制についてはあまり検討されていない。そこで、本研究では *Candida albicans* を抑制するプロバイオティクス菌を選抜し、その抑制メカニズムを解析することを目的とした。口腔プロバイオティクスに応用する候補菌株のスクリーニング試験より、ヒト口腔および食品由来乳酸菌および乳酸菌標準菌株 40 株中最も有効であった 1 菌株 (*Lactobacillus plantarum*122) が候補菌株となった。この菌株は *C. albicans* の増殖抑制だけではなく、Biofilm 形成を抑制し、さらに CFU assay の結果、殺菌的な効果を示すことが確認された。この乳酸菌株に含まれる未知の抗菌物質が *C. albicans* に対して示す殺菌効果がどのような機序であるか確認するため膜電位感受性色素 (Disc3(5)) を用いて検討した結果、膜破壊による殺菌効果は示さなかった。また、この乳酸菌由来の乳酸による殺菌効果への影響を確認するため、HPLC を用いて乳酸濃度を測定したところ、10~13% 程度であったため、同濃度の乳酸で抗菌試験を行なった結果、*C. albicans* の増殖は抑制されなかった。今回の実験では有効成分の同定をすることができなかったが、これらの結果を元に今後さらに詳細に候補乳酸菌株の有効成分の分析および同定を行なっていく予定である。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Analysis of effective component produced by oral probiotic candidates against *C. albicans*

○Kojima Y, Ohshima T, Kawai T, Maeda N

Dept Oral Microbiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Lactobacilli are widely used for fermented foods all over the world since ancient times. It has been reported that some of *Lactobacilli* produce organic active ingredient which exhibit bacteriostatic and bactericidal effects against pathogenic microorganisms. However, such suppression effect has not been well studied on oral microbiota including oral fungal flora. In this study, our purpose is to select a probiotic candidate to suppress the growth of *Candida albicans*, and to analyze the inhibition mechanism. From the screening tests of the candidate strain for the oral probiotics, one strain (*Lactobacillus plantarum*122) among 40 strains was selected. This strain showed not only growth inhibition of *C. albicans* and suppression of biofilm formation, but also the bactericidal effect was confirmed from the results of CFU assay. For the analysis of the mechanism of bactericidal effects of *L. plantarum* 122 against *C. albicans*, we assayed membrane disruption with membrane potential-sensitive dye (Disc3 (5)). But bactericidal effects due to membrane disruption was not observed. In this experiment we could not identify the active ingredient, however we plan to perform the analysis and identification of the substance further in detail based on the results.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-114 小児プラークにおけるミュータンスレンサ球菌定着量と齲蝕罹患率の関連

○蒔苗 剛¹, 下山 佑², 田中 光郎¹, 石河 太知², 古玉 芳豊², 佐々木 実²,
根本 優子³, 根本 孝幸³, 木村 重信⁴

¹岩医大 歯 小児・障害者

²岩医大 歯 分子微生物

³長大 院医歯薬 口腔生化

⁴関西女子短大 歯科衛生

【目的】ヒトのミュータンスレンサ球菌 (MS) には *Streptococcus mutans* (Sm) と *S. sobrinus* (Ss) があり, ともに小児齲蝕の主たる原因細菌であることが明らかにされている. しかしこれまでの研究は Sm, Ss の定着の有無による検討が主で, 定着量と齲蝕罹患率との関連性については依然不明な点が多く残されている. 本研究では, 菌種特異的 PCR 法 (c-PCR) および定量的リアルタイム PCR 法 (q-PCR) による, MS の定着量と齲蝕罹患率との関連性について検討を行った. さらに, 全細菌および全レンサ球菌中における MS の構成比率と齲蝕罹患率との関連性についても検討を行った.

【方法】インフォームド・コンセントの得られた小児患者 99 名を被験者とし, 口腔内診査後, 歯肉縁上プラークを採取した. サンプルより DNA を精製し, MS の c-PCR および q-PCR による解析を行った. 総菌数と総レンサ球菌数についても q-PCR を行った. 齲蝕罹患率は df 歯率を用いた.

【結果】c-PCR による MS の定性解析では, 全 99 例中 61 例 (61.6%) に Sm が, 12 例 (12.1%) に Ss が検出された. c-PCR で Sm (+), Ss (-) となった 50 例については q-PCR を併用することにより Sm^{high}-Ss⁻ 群 (30/50) および Sm^{low}-Ss⁻ 群 (20/50) に群分けされた. Sm⁺-Ss⁺ 群および Sm⁻-Ss⁻ 群を加えた 4 群間で齲蝕罹患率との関連性を検討した結果, df 歯率は Sm⁺-Ss⁺ 群が最も高く, ついで Sm^{high}-Ss⁻ 群が高かった. また全細菌および全レンサ球菌中における Sm の構成比率も Sm⁺-Ss⁺ 群で最も高かった. しかし, Sm^{low}-Ss⁻ 群と Sm⁻-Ss⁻ 群の間には df 歯率の有意な差は認められなかった.

【考察】小児プラークへの MS, 特に Sm の定着量は小児齲蝕の発症に高い関連性を有することが明らかとなり, MS の定量解析が小児における齲蝕リスクの効果的な予測手段となり得る可能性が示唆された.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Quantification of mutans streptococci in children's plaques and its relationship to the caries prevalence

○Makinae T¹, Shimoyama Y², Tanaka M¹, Ishikawa T², Kodama Y², Sasaki M²,
Ohara-Nemoto Y³, Nemoto T³, Kimura S⁴

¹Div Pediatr Dent Spec Care Dent, Iwate Med Univ Sch Dent

²Div Mol Microbiol, Iwate Med Univ Sch Dent

³Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

⁴Dept Oral Hygiene, Kansai Women's Coll

In this study, we examined the quantitative levels of mutans streptococci (MS), *Streptococcus mutans* (Sm) and *S. sobrinus* (Ss), in children's plaques and assessed its relationship to the caries prevalence.

After oral examination, plaque samples were collected from 99 children and their mothers with informed consent, and the bacterial DNA was purified. Both MS were detected by species-specific conventional PCR (c-PCR) and the levels were quantified using real-time quantitative PCR (q-PCR). The quantification of total streptococci and total bacteria was also performed by the developed q-PCR.

By the c-PCR, 50 out of 99 samples showed Sm-positive and Ss-negative [Sm(+)-Ss(-)]. Notably, the combination assay with c- and q-PCR suggested that the 50 Sm(+)-Ss(-) subjects were divided into two groups based on the quantitative level of Sm, Sm^{high}-Ss⁻ (30/50) and Sm^{low}-Ss⁻ groups (20/50). Among the 4 groups, MS-double positive group showed the highest dft score and composition ratios of Sm in total streptococci and in total bacteria, and followed by Sm^{high}-Ss⁻ group. The average dft score in Sm^{low}-Ss⁻ group was not significantly different to that in MS-negative group.

Consequently, quantification of MS in children's plaques could be an efficient method to clarify the relationship between MS colonization and childhood caries.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-115 吸収性縫合糸に対するラット皮下組織の反応

○中安 喜一¹, 松田紗衣佳¹, 正村 正仁², 大須賀直人², 川上 敏行¹

¹松歯大 院 病態解析

²松歯大 院 口腔健康分析

【目的】 グリコール酸／乳酸ポリエステル縫合糸は、生体内で徐々に分解吸収されて消失する事が知られている。今回これに対するラット皮下組織での反応を病理学的に追究した。**【材料と方法】** Wister系ラット（8週例，雄性）を用い，その背部皮下組織内にグリコール酸／乳酸ポリエステル縫合糸“バイクリル”（Vicryl[®], Johnson & Johnson）を埋入した。すなわち，ペントバルビタールによる腹腔内注射による全身麻酔下にラットの背部に切開を加え同部に Vicryl[®]を束状にして埋入，2針縫合し実験を終了した。4週後に埋入部組織を一塊として摘出し，10%中性緩衝ホルマリンで固定後，パラフィン包埋切片とし，病理組織学的に検討した。さらに，CD68について免疫組織化学的染色も行った。なお，対照材料としてコレステリン結晶（Ch）を用いた。**【結果と考察】** 病理組織学的に，実験群（Vicryl[®]），対照群（Ch）ともに埋入部に多量の肉芽組織が増殖していた。詳細に観察すると，実験群では埋入した縫合糸はその方向によって各種の大きさの空隙として観察され，周囲に線維芽細胞や単核の不定形の細胞が増殖していた。これらの細胞では単核の不規則な細胞外形を示す細胞が優位であった。さらに，増殖細胞群に介在するように若干の毛細血管があり，その多くは充血していた。Vicryl[®]に接する部位には，その一部では多核の巨細胞が多数出現していた。この巨細胞の核数は多いものでは50個を超えるものがあり，その細胞質も巨大であった。一方，対照群でも同様に，不規則な細胞外形の単核の細胞と多核の巨細胞が出現しており，大きな空隙として観察されるChの埋入部に集簇していた。免疫組織化学的に，これらの巨細胞と単核の不規則な細胞外形を示す細胞はともにCD68に強い陽性を示し，それぞれ，マクロファージ（Mφ）と異物巨細胞であることが確認された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Rat subcutaneous tissue reaction to bioabsorbable suture thread

○Nakayasu Y¹, Matsuda S¹, Shoumura M², Osuga N², Kawakami T¹

¹Hard Tissue Pathol, Matsumoto Dent Univ Grad Sch

²Oral Health Anal, Matsumoto Dent Univ Grad Sch

Aim: Polyethylene glycol-polyester lactate (polyglactin) is well known bioabsorbable suture thread. The material is gradually absorbed by granulation tissues. Thus, in the examination, we examined the subcutaneous tissue reaction to the material, using histopathological and immunohistochemical methods.

Materials & Methods: Using Wister rats, polyethylene glycol-polyester lactate (polyglactin), bioabsorbable suture thread, Vicryl[®] (Johnson & Johnson) was embedded into subcutaneously and histopathological examination was carried out in a period of 4 weeks. For control, we used cholesterol crystals. Furthermore, immunohistochemical examination for CD68 was done. **Results:** Histopathology showed granulation tissues were proliferated around the embedded Vicryl[®], in the experimental group. The majority of cells in the granulation tissues were macrophages and foreign body giant cells and the center consists of small amount of fibroblasts, collagen fibers and capillaries. Immunohistochemistry revealed that macrophages and foreign body giant cells were positive to CD68. Regarding control group, the majority of cells in the granulation tissues were macrophages and foreign body giant cells and the center consists of small amount of fibroblasts, collagen fibers and capillaries. Immunohistochemically, these cells were also positive to CD68.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-116 口腔扁平上皮癌細胞由来エクソソームによる細胞間クロストークと病態形成

○森岡 政彦^{1,2}, 川久保-安河内 友世², 中村 誠司¹

¹九大 院歯 顎顔面腫瘍制御

²福岡大 薬 免疫・分子治療

癌の浸潤・転移に対する評価は、腫瘍の進展を的確に把握するために必須であり、より精度の高い浸潤・転移評価法の開発が望まれている。近年、癌細胞が分泌するエクソソーム(細胞外小胞体の一種)が、癌における微小環境の構築に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで本研究では、同一患者由来の転移能の異なるヒト口腔扁平上皮癌細胞株2種(非転移株 SQUU-A/高転移株 SQUU-B)を用い、エクソソームが規定する癌の病態形成機構について解析を行った。マトリゲル浸潤アッセイの結果、SQUU-B由来のエクソソーム(exoB)中に浸潤能を規定する成分が存在すること、また、その浸潤能はエクソソームを介して非転移株 SQUU-Aに移行することが明らかとなった。続いて、SQUU-A由来エクソソーム(exoA)およびexoBが腫瘍進展に必須となる管腔形成に及ぼす影響について調べるため、HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)あるいはHDLEC(ヒトリンパ管内皮細胞)を用いてVEGF-VEGFR関連遺伝子の発現解析を行った。その結果、exoA/exoBを作用させたHUVECではVEGF-VEGFR関連遺伝子の変動がほとんど認められなかったのに対し、HDLECではVEGFR1, VEGFR2, VEGFR3の有意な発現上昇を認め、VEGF-A, VEGF-C, VEGF-DはexoBでのみ発現が亢進した。また、管腔形成実験においても、特にexoBがHDLECに管腔形成能を亢進させている様子が観察された。これらの結果は、単一癌巣内のそれぞれの癌細胞が各々の個性をもつエクソソームを分泌しており、それらを介した複雑な細胞間クロストークによって浸潤・転移性が規定され、この複雑な環境が予後を規定していることを示唆している。【会員外共同研究者：樋川舞, 西中川拓也, 小野和彦, 中島学(福岡大薬)】
【利益相反】利益相反状態にはありません。

Intercellular crosstalk defined by exosomes from oral squamous carcinoma cells determines its pathological process

○Morioka M^{1,2}, Kawakubo-Yasukochi T², Nakamura S¹

¹Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Dept Immun Mol, Fukuoka Univ Fac Pharm Sci

Cancer cell-derived exosomes have recently emerged as critical in cell-to-cell and cell-to-matrix communication. In this study, we examined the effect of exosomes from oral squamous carcinoma cells on cancer invasive and metastatic process, using SQUU-A (nonmetastatic) and SQUU-B (highly-metastatic) cells which were originated in the same patient. Matrigel invasion assay revealed that the exosome derived from SQUU-B (exoB) spread its metastatic potential to SQUU-A. We further evaluated the effect of exosome derived from SQUU-A (exoA) and exoB on angiogenesis and lymphangiogenesis using HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) and HDLECs (human dermal lymphatic endothelial cells). As a result, HUVECs exposed to exoA or exoB had little change in the expression levels of VEGFs and VEGFRs, which are closely related with tube formation. In contrast, the expression levels of VEGFR1, VEGFR2 and VEGFR3 in HDLECs were significantly increased by exoA and exoB, and those of VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D were increased only by exoB. Additionally, these results were reflected to structure-forming ability in tube formation assay. Our data indicate that the cancer cell-derived exosome undertakes crosstalk with different malignant cell clones in an identical tumor microenvironment and luminal cells closely related to cancer dissemination, and which may define clinical prognosis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-117 口腔扁平上皮癌における kallikrein related peptidase 6 の発現と機能に関する研究

○金子 直樹, 川野真太郎, 橋口 有真, 中村 誠司

九大 院歯 口腔顎顔面外科

【目的】 これまでに我々は、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞における Δ Np63 の発現減弱により、EMT が誘導されることを示してきたが、その分子機構は不明であった。そこで、 Δ Np63 を強制発現させた OSCC 細胞株を用いて、DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、 Δ Np63 強制発現細胞で最も発現量が増加したのは kallikrein related peptidase 6 (KLK6) であった。KLK6 は protease activated receptor (PAR) 1, 2 を活性化し、細胞の分化や増殖に関与するとされている。本研究ではその役割を明らかにするために、OSCC における KLK6 の発現ならびに EMT との関連について検討を行った。【材料と方法】 5 種類の OSCC 細胞株 (HSC-2, HSC-3, SQUU-A, SQUU-B, SAS) を用い、KLK6, PAR1, 2, および EMT 関連遺伝子の発現を検索した。さらに、OSCC の生検標本における Δ Np63, KLK6, PAR2 の発現を、免疫組織化学的に検索した。また、KLK6-shRNA 導入が OSCC 細胞へ与える影響について解析した。【結果】 Δ Np63, KLK6 および PAR2 は、多くの OSCC 細胞株で発現していたものの、高転移株の SQUU-B 細胞では発現は認められなかった。しかし、 Δ Np63 を強制発現させると KLK6 と PAR2 の発現が認められた。PAR1 については各細胞間で発現に差を認めなかった。OSCC 生検標本において、 Δ Np63 の発現と一致して KLK6 と PAR2 の発現を認め、特に癌巣において発現が強かったが、浸潤先端部ではそれらの発現が減弱していた。さらに、KLK6 の発現を認めた SQUU-A 細胞に KLK6-shRNA を導入したところ、EMT 形質が誘導された。【結論】 OSCC において、その発生と EMT に KLK6 が関与している可能性が示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Expression and function of kallikrein-related peptidase 6 in oral squamous cell carcinoma

○Kaneko N, Kawano S, Hashiguchi Y, Nakamura S

Sect Oral Maxillofac Surg, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Objective: We revealed that downregulation of Δ Np63 in OSCC induces EMT, the detailed mechanisms remain to be elucidated. DNAmicroarray analyses were thus performed by using OSCC cell line overexpressing Δ Np63. The results revealed that KLK6 was most upregulated. KLK6 is known to involve in proliferation and differentiation by activating PAR1 and 2. Purpose of this study is to clarify roles of KLK6 in OSCC. **Materials and Methods:** Expression of Δ Np63, KLK6, PAR1, PAR2, and EMT-related genes was analyzed in OSCC cell lines (HSC-2, -3, SQUU-A, -B, and SAS). Biopsy specimens from the OSCC patients were used for immunohistochemical stainings of that. In order to examine the effects of KLK6 knockdown, KLK6-shRNA was transfected into OSCC cells. **Results:** In harmony with Δ Np63 expression, KLK6 and PAR2 were expressed in the OSCC cells except for SQUU-B cells with high metastatic potential. Expression of PAR1 was found in all of the OSCC cells. In the OSCC specimens, immunoreactivities of Δ Np63, KLK6 and PAR2 were detected in the same expression pattern. However, they were decreasingly expressed at the invasive front. Silencing of KLK6 by shRNA transfection induced mesenchymal phenotypes. **Conclusions:** These results suggested that KLK6 involved in the acquisition of EMT in OSCC cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-118 歯原性腫瘍におけるメラニン沈着について

○磯村まどか¹, 佐藤 伸明¹, 河合 遼子¹, 神野 正人¹, 本田 由馬¹, 鳥井 康義¹,
吉田 和加^{1,2}, 杉田 好彦^{1,2}, 久保 勝俊^{1,2}, 前田 初彦^{1,2}

¹愛院大 歯 口腔病理

²愛院大 未来口腔医療セ

【目的】顎骨内の歯原性腫瘍に稀にメラニン沈着が生じることがあると報告されている。そこで、本研究ではエナメル上皮腫と角化嚢胞性歯原性腫瘍(KCOT)でのメラニン沈着およびメラノサイトの有無を検索した。

【方法】エナメル上皮腫(32例)とKCOT(79例:含む基底細胞母斑症候群(BCNS)12例)を対象とした。また、KCOTでは、年齢により0~20歳代の若年者群(42例)および30~70歳代の中高齢者群(37例)に分けて検索した。さらに、メラニン沈着の確定にはシュモール反応染色を、メラノサイトの有無はMelan-A免疫染色を用いて確認した。

【結果と考察】エナメル上皮腫では、全症例でシュモール反応陽性像はみられなかった。KCOTでは20.3%、BCNSでは41.7%と高率にシュモール反応陽性像が認められた。さらに、中高齢者群5.4%に対し、若年者群では52.3%と効率にシュモール反応陽性像がみられた。Melan-A免疫染色では、エナメル上皮腫3.1%、KCOT29.8%、BCNS50.0%において陽性像が認められた。さらに、KCOTでの年齢別では、中高齢者群10.8%に対し、若年者群で52.3%にMelan-A陽性像がみられた。以上の結果より、エナメル上皮腫においてメラニン沈着がみられなかった一方、KCOTにおいてメラニン沈着が認められたことから、腫瘍発生でのメラノサイトの関与が両者では異なる可能性が考えられた。また、BCNSにおいてメラニン沈着やメラノサイトが高率に認められることが明らかになったことから、遺伝子変異の関与が示唆された。さらに、若年者群で高率にメラニン沈着やメラノサイトが認められることから、KCOTの発生の起源が、発症年齢により異なる可能性も考えられた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Melanin pigmentation of odontogenic tumor

○Isomura M¹, Sato N¹, Kawai R¹, Jinno M¹, Honda Y¹, Torii Y¹, Yoshida W^{1,2}, Sugita Y^{1,2},
Kubo K^{1,2}, Maeda H^{1,2}

¹Div Oral Pathol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

²Res Inst of Adv Oral Sci, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

The purpose of this study was to determine distribution of melanin pigmentation and melanocyte in odontogenic tumor.

Thirty-two ameloblastoma and 79 keratocystic odontogenic tumor (KCOT) specimens were used. Twelve specimens of KCOT were derived from basal cell nevus syndrome (BCNS) patients. All samples of KCOT were divided into juvenile (J) group (0-29 years old) and advanced (A) groups (30-70 years old). The former is a 42, and the latter was 37 cases.

Melanin pigmentation and melanocyte were detected using Schmorl and Melan-A staining, respectively. In the ameloblastoma, no positive staining of Schmorl was observed. However, the positive rates of Schmorl staining in KCOT and BCNS were 20.3% and 41.7%, respectively. The positive rates of Melan-A staining in ameloblastoma, KCOT and BCNS were 3.1, 29.8 and 50.0%, respectively. The positive rates of Melan-A staining in Y and A groups were 52.3 and 10.8%, respectively.

In conclusion, BCNS showed high positive rate of Schmorl and Melan-A staining, it seems that genetic alterations are involved in distribution of melanin pigmentation and melanocyte. Compare to J and A groups, Melan-A positive rate was high in Y group. This suggests the possibility that the origin of KCOT in juvenile was different from elder one.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-119 認知症モデルマウスにおける唾液中の認知機能マーカーの探索

○東 雅啓¹, 杉本 昌弘^{2,3}, 猿田 樹理⁴, 山本 裕子⁵, 松尾 雅斗¹, 槻木 恵一²

¹神歯大 院歯 口腔科学・歯科形態

²神歯大 院歯 口腔科学・環境病理・口腔病理診断

³慶應大 先端生命科学研

⁴神歯大 院歯 口腔科学・唾液腺健康医学

⁵神歯大 短期 歯科衛生

認知症は近年患者数の増加が問題視され、患者本人のQOLの維持・向上のためにも、その早期診断や病態のモニタリングが必要であった。そこで我々は、認知症患者における認知機能障害の病態と唾液成分変化との関連性を科学的に明らかにするために、認知症モデルマウスを用いてメタボローム解析による唾液中の認知機能マーカーの探索を行った。認知症モデルマウスとして、アミロイドβ (20pmol/5μl PBS) を脳室内投与したアルツハイマー型モデルと、麻酔下にて両側総頸動脈を20分間閉塞しその後再疎通させる脳血管障害型モデルを用いた。各マウスにおける学習・記憶力を評価するために高架式十字迷路を使用した。そして、認知機能障害により変動する唾液成分を、キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置 (CE-TOFMS) を用いてメタボローム解析を行った。さらに、認知症モデルマウスに対して認知症治療薬として tacrine (2.5 mg/kg) を投与し、行動変化の評価を行った上で、同定した物質の中から治療薬により改善するものを検索した。行動解析の結果、脳血管障害型モデルマウスにおいて空間記憶能力の低下が認められた。そこでこのマウスの唾液中の代謝産物に関してメタボローム解析を行ったところ、コントロールと比較して様々な物質で変化が認められた。さらにはその同定された物質の中で、tacrineの投与により複数のものが変動していることを認めた。これらのことから、唾液中の代謝産物が認知機能マーカーとして有用であることが示唆され、今後は認知症患者の唾液における検討も行うことで、将来的にはヒトにおけるスクリーニング検査等への応用が期待できる。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effect of cognitive impairment on the metabolic profile of saliva of mice

○To M¹, Sugimoto M^{2,3}, Saruta J⁴, Yamamoto Y⁵, Matsuo M¹, Tsukinoki K²

¹Dept Oral Sci · Div Dent Anat, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

²Dept Oral Sci · Div Environ Pathol Oral Diagnostic Pathol, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

³Inst Adv Biosci, Keio Univ

⁴Dept Oral Sci · Div Salivary Health Med, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

⁵Dent Hygiene Kanagawa Dent Univ Junior Coll Div

There has been an increase in the number of dementia patients, and early diagnosis and monitoring are required to maintain and improve the quality of life of patients. To determine whether cognitive impairment has an effect on the metabolic profile of saliva, we investigated this change in saliva using mouse models of Alzheimer's and cerebrovascular disease. In the Alzheimer's disease model, male ddY mice were administrated amyloid-β (20pmol/5μl PBS) intracerebroventricularly. In the cerebrovascular disease model, the arteries of male ICR mice were occluded with aneurysm clips for 20 min. The elevated plus maze test revealed that mice in the cerebrovascular disease model had impaired spatial working memory and administration of tacrine improved the memory impairment; however, intracerebroventricular injection of amyloid-β did not impair the memory of mice in this group. The metabolic profile of saliva of the cerebrovascular disease model mice showed that various metabolites were altered by cerebral ischemia, and the concentrations of some components were altered by tacrine administration. Our findings indicate the presence of a novel marker in saliva for the monitoring of cognitive function. Metabolites in saliva may be useful for screening for human dementia.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-120 ヒト口腔癌細胞株における TRP チャネルの機能解析

○合島怜央奈^{1,2}, 吉本 怜子³, 曹 愛琳^{1,4}, 森 啓輔², 張 旌旗⁴, 大崎 康吉⁴, 檀上 敦², 山下 佳雄², 清島 保³, 城戸 瑞穂¹

¹佐賀大 医 組織神経解剖

²佐賀大 医 歯科口腔外科

³九大 院歯 口腔病理

⁴九大 院歯 分子口腔解剖

TRP (transient receptor potential) チャネルは温度や化学物質, 浸透圧変化などの多様な刺激に応答する Ca^{2+} 透過性の高い非選択的陽イオンチャネルである. がん細胞における TRP チャネルの発現や機能異常の報告があるが, 口腔癌での役割は不明な点が多い. 口腔内は TRP チャネルの活性化を引き起こす多様な刺激環境にあり, 口腔癌における TRP チャネルの発現と機能的役割について解析した. 口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4) ではヒト正常皮膚上皮細胞株 (HaCaT) と比較し, TRPV3 チャネルが高く発現していた. 高分化型口腔扁平上皮癌である HSC4 では TRPV4 チャネルの発現が mRNA およびタンパクレベルで高かった. 口腔癌細胞株へ TRPV3 および TRPV4 のアゴニストを添加すると細胞内カルシウム濃度が上昇した. HSC4 への TRPV4 アゴニスト投与では HSC2 や HSC3 と比較して高いカルシウム応答が確認された. TRPV4 アゴニスト投与によりストレス応答性 MAPK 経路である p38 や JNK シグナルのリン酸化が促進された. siRNA を用いて TRPV4 のノックダウンを行うと細胞間接着の重要な因子である E-cadherin や β -catenin の発現が減弱した. 以上より口腔内環境や癌微小環境が機能的な TRP チャネルを介して, 口腔癌の病態形成に重要な影響を与えることが示唆された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Analysis of TRP channels in human oral squamous cell carcinoma

○Aijima R^{1,2}, Yoshimoto R³, Cao AL^{1,4}, Mori K², Zhang JQ⁴, Ohsaki Y⁴, Danjo A², Yamashita Y², Kiyoshima T³, Kido M¹

¹Div Histol & Neuroana, Fac Med, Saga Univ

²Dept Oral & Maxillofac Surg, Fac Med, Saga Univ

³Sect Oral Pathol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

⁴Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

TRP (transient receptor potential) channels are Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels that are responsive to a various environmental stimuli such as temperature, chemicals, or osmotic stress. Several studies have reported abnormal expression and/or activity of the TRP channels in cancer cells. However, little has been reported on the role of TRP channels in oral cancer. The oral cavity experiences drastic variation stimuli, which can active TRP channels. In this study, we investigated functional expression and the roles of TRP channels in oral cancer. TRPV3 mRNA was more highly expressed in human oral squamous cell carcinoma (OSCC; HSC2, HSC3, HSC4) than a human normal skin keratinocytes (HaCaT). HSC4, well-differentiated squamous cell carcinoma, the most highly expressed TRPV4 at mRNA and protein levels. TRPV3 and TRPV4 agonists increased intracellular Ca^{2+} concentration in oral cancer cells. Furthermore, application of the TRPV4 agonist significantly increased intracellular Ca^{2+} concentration in HSC4 compared with HSC2 and HSC3. TRPV4-agonist stimulation led to increased p38 and JNK phosphorylation in OSCCs. Finally, TRPV4-knocked down HSC4 by siRNA decreased the expression of key component of adherence junction. These results suggested that environment of the oral cavity or tumor microenvironment affected pathological OSCCs via TRP channels.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-121 多段階癌抑制分子のケモカイン CXCL14/BRAK は扁平上皮組織の分化制御分子か？

○生駒 丈晴¹, 陽 暁艶^{2,3}, 小澤 重幸¹, 前畑洋次郎², 畑 隆一郎^{2,3}

¹神歯大 院 顎顔面外科

²神歯大 院 口腔科学

³神歯大 院 口腔難治疾患研

【目的】扁平上皮組織では、基底細胞層に存在する組織幹細胞が増殖・分化をしながら上層へと移動する。この過程で幹細胞は有棘細胞、顆粒細胞となり、最終的に角化する。すなわち角化とは上皮細胞の分化過程である。ケモカイン CXCL14/BRAK (以下 CXCL14) は扁平上皮癌組織において発現が低下、あるいは消失する遺伝子で、我々によって癌抑制分子であることが最初に報告された。癌は発癌、増殖、転移と多段階で進展していくが、この過程には多くの遺伝子が関与する。興味あることに、CXCL14 はこれらのすべての段階を抑制する多段階癌抑制分子であることを我々は最近明らかにした。癌細胞は正常細胞と比較し、低分化な状態であり、低分化の細胞では CXCL14 は発現しない遺伝子という仮説に基づき、CXCL14 の遺伝子発現レベルと上皮細胞の分化の関連について検討した。【方法】免疫染色法を用いて、正常上皮組織における CXCL14 の局在を検討した。また扁平上皮癌細胞株 HSC-3 に上皮細胞の分化誘導刺激を加えて、マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析を基に、ナラプロテクトロノロジーと共同研究を行い、CXCL14 の遺伝子発現上昇に関与する候補転写因子群の検索を行った。【結果】免疫染色を行った結果、正常上皮組織において、主に有棘細胞層で CXCL14 の発現が確認された。また上皮細胞の分化誘導刺激を加えると著しい CXCL14 の遺伝子発現上昇とともに、上皮細胞の分化マーカー分子であるトランスグルタミナーゼやインボルクリンの遺伝子発現上昇が確認された。また CXCL14 の遺伝子発現上昇にカルモジュリン-SP1 シグナルが重要であることを見出した。【考察】CXCL14 は分化傾向を示す部位で発現することが確認された。CXCL14 は癌抑制分子として見出されたが、本来、上皮の分化を制御する分子の可能性が示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Is chemokine CXCL14, a multi-step tumor suppressor, a differentiation regulator of squamous epithelial cells ?

○Ikoma T¹, Yang X^{2,3}, Ozawa S¹, Maehata Y², Hata R^{2,3}

¹Dept Oral Maxillofac Surg, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

²Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

³Oral Health Sci Res Center, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

Background: Epithelial basal cell layer is comprised of immature keratinocytes. Cell-cell contact is known to be a critical regulator of cellular differentiation and motility. CXCL14 is a chemokine that is expressed in various normal tissues but is absent or least expressed in cancerous tissues. In this connection, CXCL14 is rarely expressed in immature cells, we determined whether or not cell adhesion signaling, induced by high cell density culture up-regulates the expression of CXCL14 and differentiation markers in squamous epithelium. **Observation:** CXCL14 protein was immunohistochemically detected in middle layer of the epithelium, which was considered to be differentiating keratinocytes. We determined effect of cell adhesion signaling in differentiation of keratinocytes. CXCL14 mRNA was up regulated when the number of cells in culture was increased, and this accompanied by increase in cell differentiation markers for squamous epithelium. We previously reported that GC box, which was important for the expression of CXCL14 mRNA, binds SP-1 transcription factor located on 14 bp upstream of the transcription start site of CXCL14 gene. Interestingly, CXCL14 mRNA up-regulation by cell adhesion signaling was inhibited by sh-RNA against SP-1. **Conclusion:** We propose the possibility that CXCL14 is a new differentiation marker and a regulator of epithelial cell differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-122 ユビキチン・プロテアソーム系による染色体パッセンジャー複合体タンパク質 Borealin の発現制御機構とその意義

○常松 貴明, 工藤 保誠, 山田安希子, 新垣理恵子, 石丸 直澄

徳大 院医歯薬 口腔分子病態

細胞分裂では、染色体がダイナミックに形態を変化し、均等に分配される。その制御機構の異常は不均等な染色体分配を引き起こすことから、癌でみられる染色体不安定性の主たる原因と考えられている。細胞分裂の中心的役割を担う染色体パッセンジャー複合体は、Aurora-B キナーゼ、Borealin, Survivin および INCENP の4つの構成因子よりなり、種々の癌組織において、これらの構成因子の過剰発現が報告されていることから、癌との関連や治療標的として着目されている。しかし、これらのタンパクの発現制御機構は未だ明らかとなっていない。本研究では、Borealin タンパクの発現制御機構に着目し、検討を行った。その結果、Borealin タンパクが細胞周期依存的に APC/C^{Cdh1} (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) ユビキチンリガーゼ複合体によってユビキチン化され、分解されることを見出した。さらに、その分解制御機構の詳細を明らかにした。また、培養細胞株への Borealin の過剰発現は染色体数の著明な増加を誘導し、癌化に関与することも見出した。以上より、Borealin のタンパク量の適切な制御は染色体数の恒常性維持に必須であり、染色体不安定性を防ぐ重要な機構である可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Ubiquitin proteasome pathway regulates Borealin stability and its significance

○Tsunematsu T, Kudo Y, Yamada A, Arakaki R, Ishimaru N

Dept Oral Mol Pathol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

Cell division is the most fundamental event. In this event, mitosis is remarkable phase which cells undergo dynamic changes in their structure and physiology. Therefore, deregulation of mitosis induces genomic instability. During mitosis, chromosome passenger complex (CPC) plays an important role in the proper chromosome segregation. CPC is composed by Aurora-B kinase, Borealin, Survivin, and INCENP. It has been reported that CPC proteins are frequently overexpressed in various cancers. However, the regulation of CPC proteins expression remains unclear. Therefore, in this study, we focused on the regulation of Borealin protein. We found that Borealin protein was ubiquitylated by APC/C^{Cdh1} (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) ubiquitin ligase complex. Moreover, we clarified the detailed regulation of ubiquitylation of Borealin protein. Ectopic overexpression of Borealin induced aneuploidy. These findings suggest that the proper regulation of Borealin protein may be essential for genomic stability to prevent from chromosome breakage and/or aneuploidy.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-123 口腔扁平上皮癌における miR-205 の発現と機能に関する研究～特に Δ Np63 との関連について～

○橋口 有真, 川野真太郎, 金子 直樹, 中村 誠司

九大 院歯 顎顔面腫瘍制御

【目的】近年、癌の浸潤・転移に上皮-間葉転換 (EMT) が関与していることが明らかとなってきた。これまでに我々は、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞に p53 のホモログである Δ Np63 の発現減弱が生じると、EMT 形質が誘導されることを示してきた。しかし、その詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。最近の研究では、microRNA (miR) が EMT のプロセスにも関与していることが示唆されている。そこで本研究では、 Δ Np63 を介した EMT に関与する miR の検索とその機能について検討を行った。【材料および方法】 Δ Np63 の発現を認めない OSCC 高転移株 SQUU-B 細胞に、 Δ Np63 を強制発現させた細胞株 (SQUU-BO) と、control vector を導入した細胞株 (SQUU-BC) を用いて miR マイクロアレイ解析を行った。その結果、最も変動が大きかったものを候補 miR とし、OSCC 細胞株における発現を検索した。また、候補 miR の標的遺伝子を複数のデータベースから同定し、同様に発現を検索した後、miR mimic/inhibitor を遺伝子導入し、それらの発現への影響を解析した。【結果】マイクロアレイ解析の結果、SQUU-BO 細胞において最も発現が増加していた miR-205 を、 Δ Np63 を介した EMT に関与する候補 miR とした。real-time PCR 法にてバリデーションを行ったところ、 Δ Np63 が発現していない SQUU-B、-BC 細胞では miR-205 の発現を認めず、 Δ Np63 を発現している細胞株では miR-205 が発現していた。また、miR-205 の標的遺伝子であり、E-cadherin の発現を制御している ZEB の発現は、miR-205 の発現と逆相関していた。さらに、SQUU-B 細胞に miR-205 の強制発現を行ったところ、ZEB の発現量減少、上皮系マーカーの発現量亢進を認め、miR-205 の発現している細胞株に miR-205 の発現抑制を行うと、これと逆の結果となった。【考察】本研究から、OSCC における Δ Np63 の発現減弱により、miR-205 の発現が低下し、その結果 ZEB の発現が亢進することで EMT が誘導されている可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Expression and function of microRNA-205 in oral squamous cell carcinoma

○Hashiguchi Y, Kawano S, Kaneko N, Nakamura S

Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Objective: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays important roles in cancer progression. We revealed that downregulation of deltaNp63 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) induces EMT, but the detailed mechanisms remain to be unclear. Recent studies demonstrated several miRNAs are associated with EMT process. In this study, we addressed to identify miRNAs related EMT and analyze its functions. **Materials & Methods:** miRNAs-microarray analyses were performed by using OSCC cells overexpressing deltaNp63. Expression of identified miR and EMT-related-genes was analyzed by real-time-PCR methods in OSCC cell lines. In order to examine the effects of endogeneous identified miR, miRNA-mimics and miRNA-inhibitors were transfected into OSCC cells. **Results:** miRNAs-microarray analyses revealed that miR-205 was most upregulated in the OSCC cells overexpressing deltaNp63. Expression of miR-205 was not found in OSCC cells with downregulation of deltaNp63, expression of zinc finger E-box binding homeobox protein (ZEB) that have been targeted by miR-205 was opposite correlation with expression of miR-205. Upregulation of miR-205 by miR-205-mimics transfection decreased expression of ZEB, increased expression of epithelial markers. On the other hand, silencing of miR-205 induced opposite results. **Conclusion:** These results suggest that miR-205 expression was regulated by deltaNp63 and might play a critical role in EMT process in OSCC cell lines.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-124 *P.gingivalis* 歯性感染による NASH 病態進行における TLR2 の役割

○古庄 寿子, 長崎 敦洋, 宮内 陸美, 高田 隆

広大院医歯保 口腔顎顔面病理病態

【目的】非アルコール性脂肪性肝(NASH)は脂肪肝より起こり、肝硬変・肝癌へと進展する可能性がある。我々は、*P. gingivalis* (*Pg*)の歯性感染がNASHの病態を増悪することを報告した(Furusho et al. 2013)。しかし、その機序は未だ明らかでない。そこで、本研究では、*Pg* 歯性感染で誘導される肝細胞やマクロファージ(MΦ)の活性化におけるTLR2 (*Pg*-LPSの受容体)の役割を明らかにすることを目的に以下の検討を行った。【材料と方法】1) 野生型(WT)およびTLR2KOマウスに、普通食(CD)および高脂肪食(HFD)を与えて8週後に、それぞれ半数の上顎第1臼歯歯髄に*Pg*を感染させ*Pg*非感染群における変化と比較した。感染6週後に肝臓を回収し、TLR2発現状況とMac2陽性MΦの浸潤面積を*Pg*感染/非感染群で比較した。2) ヒト肝細胞株およびMΦ株に、パルミチン酸処理によって脂肪化細胞モデルを作成し、*Pg*-LPSによって誘導されるサイトカイン発現に対するTLR2阻害薬の影響を検討した。【結果】1) WTでは、CD群と比較してHFD群でのTLR2発現およびMΦ陽性領域増加がみられ、*Pg*感染によりMΦ陽性領域は増加していた。一方、TLR2KO群ではMΦ陽性面積は小さく、脂肪化や*Pg*感染の影響はみられなかった。2) 脂肪化肝細胞では、TLR2発現が上昇し、炎症性サイトカイン発現が誘導された。一方、MΦでは*Pg*-LPS誘導炎症性サイトカイン発現増加に、脂肪化の影響はみられなかった。TLR2阻害薬は、両細胞において*Pg*-LPS誘導炎症性サイトカイン発現増加を顕著に抑制した。【考察と結論】脂肪肝での肝細胞の脂肪化およびMΦの増加を介したTLR2発現の増加は、*Pg*に対する反応性を高め、過剰な炎症反応を起こすことでNASHの病態増悪につながるということが明らかとなった。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Key roles of TLR2 in NASH pathological progression by *P. gingivalis* odontogenic infection

○Furusho H, Nagasaki A, Miyauchi M, Takata T

Dept Oral Maxillofac Pathobiol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Objective: Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) develops from fatty liver and potentially progresses to lethal diseases. Recently, we reported that *Pg*-odontogenic infection exacerbated progression of NASH (Furusho et al. 2013). However, its detailed mechanisms are still unclear. We aimed to clarify roles of TLR2 in activating hepatocytes and macrophages (MΦ) caused by *Pg*odontogenic infection. **Materials and Methods:** 1) WT and TLR2KO mice were 8-week-fed by Chow Diet (CD) and High Fat Diet (HFD), then the half of each were infected with *Pg* from pulp. After 6-week-infection, immunoexpression of TLR2 and Mac2-positive MΦ-area in liver were analyzed. 2) We used human hepatocytes and MΦ cell lines. Effects of TLR2 inhibitor on *Pg*-LPS-induced cytokine expression were compared between cells with/without palmitate-treatment. **Results:** 1) In WT-HFD groups, TLR2-expression in liver and MΦ-infiltrating area was significantly increased, compared to WT-CD groups. However, in TLR2KO mice, MΦ-area was unchanged. 2) In steatotic hepatocytes, *Pg*-LPS markedly upregulated cytokines expression via upregulating TLR2. Palmitate-treatment didn't show any effect on *Pg*-LPS-induced cytokine expression in MΦ. TLR2 inhibitor suppressed *Pg*-LPS effects on MΦ. **Conclusion:** In fatty liver, upregulation of TLR2 by hepatocyte-steatosis and MΦ-recruitment, induces excessive inflammation through increasing reactivity to *Pg*-LPS, eventually leads to exacerbating NASH progression.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-125 口腔扁平上皮癌において Gli 阻害剤(GANT61)は細胞死を誘導する

○三上友理恵¹, 永田 健吾², 和田 裕子², 藤井 慎介², 安部みさき³, 吉本 怜子², 清島 保², 中村 誠司¹

¹九大 院歯 顎顔面腫瘍制御

²九大 院歯 口腔病理

³九大 院歯 口腔顎顔面外科

【背景】 Hedgehog シグナル経路は発生過程において重要な働きをしているだけでなく、近年、様々な癌形成および進展に関与していることが報告されている。さらに、Glioma-associated oncogene family zinc finger 1 (Gli-1) は Hedgehog 経路の転写因子の一つであり、癌の浸潤能への関与についても報告されている。一方、口腔扁平上皮癌(OSCC)の癌形成における Gli-1 の役割は不明であるため、本研究では、OSCC 細胞株の生存における Gli-1 の機能解析を行うこととした。

【方法・結果】 当研究室にて所有する OSCC 細胞株における Gli-1 の mRNA, タンパクレベルでの発現を検討したところ、HSC-2 が最も高発現していた。そこで、HSC-2 を用いて Gli-1 の癌形成における役割について検討した。Gli Inhibitor である GANT 61 を HSC-2 培養下にて添加し、MTS assay による細胞残存数の測定、Annexin 法、TUNEL 法、および DNA ladder 法を用いてアポトーシスに与える影響について検討した。その結果、GANT61 濃度依存的に HSC-2 の細胞残存数が減少していた。また、GANT61 添加群では Annexin 陽性細胞および TUNEL 陽性細胞の増加、および DNA ladder 法で DNA の ladder が検出された。【結論】 GANT61 は Gli-1 を高発現する HSC-2 細胞株のアポトーシスを誘導した。【考察】 Gli-1 を介した Hedgehog シグナル経路が、OSCC 細胞株の生存を制御する可能性が示唆されたことから、癌形成に関与する新たな癌の分子標的となる可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Inhibitor of Gli (GANT61) induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma

○Mikami Y¹, Nagata K², Wada H², Fujii S², Abe M³, Yoshimoto R², Kiyoshima T², Nakamura S¹

¹Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Oral Pathol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

³Sect Oral Maxillofac Surg, Kyushu Univ Grad Sch Dent

Hedgehog signaling pathway plays a pivotal role in the development stages. The signaling is also thought to be involved in carcinogenesis and multi-drug resistance in several malignant tumors through the functions of Glioma-associated oncogene family zinc finger 1 (Gli-1), a transcription factor of the Hedgehog signaling pathway. However, there is little information regarding the effects of Gli inhibitors on oral squamous cell carcinoma cells (OSCCs). In this study, the effects of a Gli inhibitor, GANT61, on the cell survival/proliferation and apoptosis of OSCCs were investigated *in vitro*. HSC-2 highly expressed Gli-1 mRNA and protein among several OSCCs. GANT61 treatment reduced the cell number of the HSC-2 cells compared with that observed in the untreated cells, showing that these cells were sensitive to GANT61. The combination of Annexin V-FITC and propidium iodide revealed early apoptotic cells, late apoptotic cells, and viable cells in the GANT61-treated HSC-2 cells. The GANT61 treatment also increased in the ratio of the TUNEL-positive cells and induced DNA ladder formation. These findings were suggestive of GANT61-induced apoptosis in HSC-2 cells. These findings suggest that GANT61 could have an anti-tumor effect on OSCCs.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-126 アレコリンによる歯肉上皮細胞での DNA 異常メチル化について

○Adhikari Bhoj Raj¹, 植原 治², 清水 綾¹, 平井 大地¹, 森川 哲郎¹, Neopane P¹,
高井 理衣³, 佐藤 惇¹, 西村 学子¹, 安彦 善裕¹

¹北医療大 歯 臨床口腔病理

²北医療大 歯 保健衛生

³北医療大 歯 小児歯

Aberrant DNA methylations in gingival epithelial cells stimulated with arecoline

○Adhikari B¹, Uehara O², Shimizu A¹, Hiraki D¹, Morikawa T¹, Neopane P¹, Takai R³,
Sato J¹, Nishimura M¹, Abiko Y¹

¹Div Oral Med Pathol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

²Div Dis Control Mol Epidemiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

³Div Pediatr Dent, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Objective: Oral squamous cell carcinoma and oral dysplasia are related to betel quid chewing habit. One of the major components in the betel quid is Arecoline, which is a byproduct of areca nut and slaked lime. Although a few aberrant gene expressions were shown in Arecoline-induced carcinogenesis, little information about aberrant DNA methylation has been shown in it thus far. In the present study, we examined genome-wide analysis of DNA methylation in human gingival epithelial cells (HGEP) stimulated with Arecoline. **Methods:** HGEP were grown in Epithelial Culture Medium. The culture of HGEP was repeated, alternating 3 days with Arecoline (50 µg/ml) and 3 days without Arecoline for 1 month. Untreated samples were used as controls. DNA and RNA were extracted from the samples. DNA was analyzed by Human CpG Island Microarray (Agilent technology). A global analysis of mRNA expression was carried out using DNA microarray (human SurePrint G3 Human GE Microarray). In order to confirm the reproducibility of the Microarray data, DNA samples were treated with sodium bisulfite and quantitative Methylation Specific PCR (SYBR[®] Green). Expression of mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR. Results were compared by Mann-Whitney U test with P-value <0.05 accepted as statistically significant. **Results:** Overall, there were 8636 and 7392 2X hyper- and hypomethylated genes respectively. We found 77 hypermethylated genes followed by decreased expression of their mRNA. The hypermethylated sites of 69 out of 77 genes are located close to the promoter region up to -1000. Among these genes SPON3, IKBKB, HNRNP3, DUSP4, ASRGL1 were the 5 most significant hypermethylated genes within this field. The hypermethylation of these genes affected their transcriptional levels. **Conclusion:** These results indicate that DNA hypermethylations may be involved in the decreased expression of transformation-related genes in oral epithelial cells stimulated with Arecoline.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-127 エピジェネティクス修飾を受けたマラッセ上皮様細胞における幹細胞マーカーの発現上昇

○吉田 光希¹, 森川 哲郎¹, Adhikari Bhoj Raj¹, 原田 文也¹, 中條 貴俊¹, 植原 治², 佐藤 惇¹, 西村 学子¹, 齊藤 正人³, 安彦 善裕¹

¹北医療大 歯 臨床口腔病理

²北医療大 歯 保健衛生

³北医療大 歯 小児歯

【目的】 エピジェネティクスは、幹細胞の維持や脱分化などを含む様々な細胞分化を制御している。DNA 脱メチル化剤 (5-Azacytidine, 5Aza) により線維芽細胞が幹細胞化することが報告されている (Nature. 2008)。Sox2 は歯堤上皮において発現するが、マラッセ上皮細胞 (Epithelial cell rests of Malassez: ERM) では発現しない (Eur J Oral Sci. 2013)。そこで本研究では、ERM にエピジェネティクス修飾をターゲットとして薬剤を作用させ、多能性について検討した。**【方法】** ERM を、各薬剤添加条件下にて DMEM および ES 細胞用培地にて 7-28 日間培養した。添加条件: コントロール群, 0.1-10 μ M 5Aza 単独添加群, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の 2 mM バルプロ酸 (Valproate, Vpa) 単独添加群, 5Aza と Vpa 共添加群。定量的 RT-PCR 法を用いて幹細胞マーカーの Nanog, Oct3/4, Sox2, Klf4 mRNA 発現を比較検討した。Alkaline Phosphatase 染色, Nanog, Oct4 の免疫組織化学染色を行った。Kruskal-Wallis 検定を用いて、有意差検定を行った。**【結果】** 14 日間培養において、コントロール群に比べ 1 μ M 5Aza と Vpa 共添加群において Nanog, Oct3/4, Sox2, Klf4 mRNA 発現が有意に上昇した ($p < 0.05$)。また、Alkaline Phosphatase 染色, Nanog, Oct4 の免疫組織化学染色では 14-28 日培養群において陽性反応を示した。**【結論】** エピジェネティクス修飾は、ERM を脱分化させる可能性のあることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Upregulated expressions of stem cell markers in Epithelial cell rests of Malassez stimulated with epigenetic agents

○Yoshida K¹, Morikawa T¹, Adhikari B¹, Harada F¹, Chujo T¹, Uehara O², Sato J¹, Nishimura M¹, Saitoh M³, Abiko Y¹

¹Div Oral Med Pathol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

²Div Dis Control Mol Epidemiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

³Div Pediatr Dent, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Objective: Epigenetic mechanisms regulate multiple aspects of normal development including stem cell maintenance and differentiation. Fibroblasts can be reprogrammed to pluripotency by the stimulation with DNA demethylated agents 5-Azacytidine (5Aza) (Nature. 2008). Sox2 was localized in dental lamina but not in Epithelial cell rests of Malassez (ERM) (Eur J Oral Sci. 2013). We observed pluripotency in ERM treated with epigenetic agents. **Methods:** ERM were cultured in DMEM or ES cell medium containing under the following conditions for 7-28 days: control; 0.1-10 μ M 5Aza; 2 mM Valproate (Vpa) as a HDAC inhibitor; both 5Aza and Vpa. The expression levels of Nanog, Oct3/4, Sox2 and Klf4 mRNA were observed by quantitative RT-PCR. Cells were stained Alkaline Phosphatase (ALP) and were immunocytochemically stained with Nanog and Oct4. The significance of the differences was analyzed using by Kruskal-Wallis test. **Results:** Expression levels of Nanog, Oct3/4, Sox2 and Klf4 mRNA in ERM stimulated with both 1 μ M 5Aza and Vpa were significantly higher than in controls on the 14th days ($p < 0.05$). Cells were positively stained with ALP, Nanog and Oct4 on the 14-28th days. **Conclusion:** Epigenetic agents may induce dedifferentiation of ERM.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-128 17α -estradiol は GPR30-SPAK-KCC2 シグナル伝達を制御し興奮性 GABA を是正する

○塚原 飛央¹, 古川みなみ², 佐藤 友明¹

¹鹿大 院医歯 応用薬理

²鹿大 院医歯 矯正

閉経後の女性は概して、ストレスに脆弱であると報告されている。これは、生体におけるエストロゲンの減少に起因すると考えられているため、エストロゲン補充療法が気分障害などのストレス脆弱性疾患の治療に有効とされている。しかし、エストロゲンの末梢に対する副作用により、使用法が限定されているのが現状である。我々は、主たる女性ホルモンである 17β -estradiol の異性体であり、女性化作用の少ない 17α -estradiol ($\alpha E2$) の神経精神疾患に対する効果を難治性疾患にみられる GABA が海馬で興奮性に作用する、反復ストレス負荷卵巣摘出マウスを使用し、検討することにした。【方法】8 週齢の C57/BL6J マウスの両側卵巣摘出を行い、コントロール群とストレス負荷群にわけた。ストレス群のマウスは、一日一回、胃管チューブの挿入によるストレスを受けた。コントロール群は、自由に飲食が出来た。ストレスを 21 日間負荷した後、行動実験および免疫染色を行った。【結果】免疫染色により、ストレス負荷群で G-protein-coupled-receptor 30 (GPR30) の過剰発現を認めた。また、GABA が抑制性に作用するために必須である K^+ - Cl^- co-transporter 2 (KCC2), KCC2 の活動性を決める STE20-related proline/alanine-rich (SPAK), GPR30 が $\alpha E2$ の投与により、全ての行動試験、形態学的定量化により連動して変化し、正常化された。さらに、 $\alpha E2$ の作用は、GPR30 の作用に類似し、同拮抗薬により、その作用は消失した。【考察】上記の結果より $\alpha E2$ は SPAK-KCC2 のシグナル伝達を制御する際に GPR30 のシグナル伝達に関与している可能性が示唆された。GPR30 は性ホルモン作用が少ないことから、GPR30-SPAK-KCC2 を制御する $\alpha E2$ は、閉経後女性の神経精神疾患の新規治療薬となり得ることが示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

17α -estradiol prevents GABA functional switch to excitatory via regulating GPR30-SPAK-KCC2 signaling

○Tsukahara T¹, Furukawa M², Sato T¹

¹Dept Appl Pharmacol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Dept Orthodont, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

There is a considerable amount of evidence which indicates postmenopausal women are vulnerable to stress, likely related to the decline of circulating estrogen. Thus, estrogen replacement therapy (ERT) attenuate stress induced psychiatric diseases. However, the side effect of the main estrogen 17β estradiol limits the use. Therefore, in this study, we aimed to investigate the effect of the non-feminizing hormone 17α estradiol ($\alpha E2$) as an anti-psychotic medicine, using a repeated stress (RS) ovariectomized (OVX) mice model of depolarizing GABA which is seen in refractory disease. 8-week-old C57/BL6J mice were OVX and/or RS were conducted for 21-days and followed by behavior tests and immunohistochemical studies. We found that G-protein-coupled-estrogen-receptor (GPR30) was overexpressed in the hippocampus of RS-OVX mice. Here we address that $\alpha E2$ prevents all the alterations of GPR30, K^+ - Cl^- co-transporter (KCC2; critical transporter for inhibitory GABA), STE20-related proline/alanine-rich (SPAK; the master regulators of KCC2 activity) and behavior abnormalities. The normalization of KCC2 expression in the hippocampus were enough to prevent the GABAergic dysfunction. In summary, $\alpha E2$ mimicked the effect of GPR30 agonist. These results indicate that $\alpha E2$ regulate KCC2 activity through SPAK with involvement of GPR30. Thus, we suggest $\alpha E2$ as a promising medicine for treatment of neuropsychiatric diseases in postmenopausal women.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-129 NR4A1に着目した薬物性歯肉増殖症のメカニズム解明の研究

○岡信 愛, 松田 真司, 加治屋幹人, 藤田 剛, 栗原 英見

広大院医歯保 歯周

【目的】

薬物性歯肉増殖症（増殖症）は抗けいれん薬フェニトイン、カルシウム拮抗薬、免疫抑制薬シクロスポリン（CsA）を服用する患者の副作用で、歯肉の肥厚を特徴とする歯周疾患である。高齢化や医療の発展によって上記薬剤を内服する患者は増加しており、それに伴い増殖症患者も増加すると予想される。現在増殖症の治療法は変薬また歯肉切除であるが、薬剤の変更が困難な場合や歯肉切除後も再発するケースは稀ではない。この問題点を解決するためには増殖症のメカニズム解明が重要である。近年、核内受容体 NR4A1 が線維症の増悪に関与していることが明らかとなった。NR4A1 は TGF- β シグナルを制御することでコラーゲンの過剰産生を抑制するが、線維症ではその機構が破綻することが明らかとなっている。そこで本研究は増殖症に NR4A1 が関与している可能性を想定し、CsA 誘導性増殖症マウスモデルを用いてそのメカニズムを解明することを目的とした。

【材料と方法】

増殖症はマウス（C57BL/6）の上顎第二臼歯に絹糸を結紮し、一週後に CsA（50 mg/kg/day）を腹腔内投与して発症させた。増殖症の程度は HE 染色と歯肉の幅径を定量し評価した。増殖症発症の詳細なメカニズムを解析するために、絹糸結紮 1, 2 週後、および結紮 1 週後に CsA を 1 週間投与したマウスの歯肉組織中の *Tgfb*, *Nr4a1* の発現を RT-PCR で解析した。

【結果と考察】

CsA 投与群の歯肉幅径は、対照群と比較して有意に増加した。組織学的観察で CsA 投与群の結合組織の肥厚が観察された。さらに RT-PCR の結果から、絹糸結紮 1 週後、2 週後において *Tgfb* と *Nr4a1* の発現の上昇を認めた。CsA 投与は *Nr4a1* の発現を抑制した。以上のことから、CsA による NR4A1 の発現減少が TGF- β の負の制御機構を阻害することで、歯肉肥厚を引き起こすことが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Elucidation of the role of Nr4a1 in drug induced gingival overgrowth

○Okano A, Matsuda S, Kajiya M, Fujita T, Kurihara H

Dept Periodontal Med, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Purpose: Drug-induced gingival overgrowth (DiGO) is a side effect principally associated with anticonvulsant (e. g. phenytoin), various calcium channel blockers, or immunosuppressant (e. g. cyclosporine A). Medical advances and aging society may increase DiGO patients. Orphan nuclear receptor NR4A1 is recently reported to participate in exacerbation of fibrosis. Although NR4A1 regulates TGF- β signaling and inhibits the excess collagen production, this mechanism fails to function in fibrosis. We hypothesized that NR4A1 is involved in DiGO and aimed to elucidate the role of NR4A1 in mice DiGO models.

Materials and Methods: The maxillary second molars of C57BL/6j mice were ligated with 5-0 silk threads for one or two weeks. Some of 1-week silk thread ligatured mice were administrated cyclosporine A (CsA, 50 mg/kg/day) for 1 week. Gingival width measuring and histological evaluation assessed gingival overgrowth. The expressions of *Tgfb* and *Nr4a1* mRNA in mice gingival tissue were analyzed by RT-PCR.

Results and Conclusion: The combination of ligature and CsA administration induced significant gingival overgrowth. Ligature increased *Tgfb* and *Nr4a1* mRNA expressions, but did not induce gingival overgrowth. CsA inhibited *Nr4a1* mRNA expression. These results are suggesting that the reduced NR4A1 expression by CsA inhibited negative feedback in TGF- β signaling and induced gingival overgrowth.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-130 致死性低ホスファターゼ症モデルマウスに対する新規 TNALP 高発現遺伝子治療による硬組織石灰化不全の改善と延命効果

○高橋 有希^{1,3}, 池上 良², 平井 幸彦³, 笠原 正貴¹

¹東歯大 薬理

²東歯大 クラウン補綴

³日医大 生化・分子生物

低ホスファターゼ症 (HPP) は、組織非特異的アルカリホスファターゼ遺伝子 (TNALP) の変異により、血中のアルカリホスファターゼ (ALP) 濃度が低下し、硬組織の石灰化不全、呼吸困難、痙攣発作、乳歯の早期脱落を主徴とする遺伝性疾患であり、本邦においては致死性である周産期型や乳児型の頻度が高い。現在、酵素補充療法が行われているが、酵素の半減期が短いため、長期反復投与の必要性があり、また侵襲性も高い。すでに我々は、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる遺伝子治療実験を行うことにより、単回投与で延命効果を得ることに成功している。しかしながら、硬組織石灰化不全の治療効果に関しては課題が残され、低身長や易骨折性、乳歯の早期脱落に対しての有効な治療法はない。したがって、本研究では、硬組織に分布する ALP 濃度を上昇させるための至適 AAV ベクター投与量を検討し、硬組織石灰化不全の改善の可能性を検討することを目的とした。生後 1 日齢の HPP モデルマウス大腿四頭筋に TNALP を発現するよう構築した AAV ベクターを筋肉注射し、90 日齢で大腿骨のレントゲン撮影を行い、解析した。血中の ALP 活性を 20 U/mL まで上昇させた結果、未治療マウスは 30 日以内に死亡するのに対し、治療マウスは 90 日までの延命効果が認められた。また、行動量も増加し、大腿骨の形態不正や伸長不全の改善が確認された。今回の結果より、硬組織に十分な量の ALP を補充することにより、その石灰化不全の改善が可能であることが示唆された。今後、血中 ALP 濃度を増加させたことによる全身および局所の安全性や発現効率の上昇による投与ベクターを減量した上での ALP 濃度増加等を検討していく予定である。本研究結果は、生後でも硬組織に十分な量の ALP を補充することにより、重症乳児 HPP 患者の QOL を高められる可能性を示している。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Prolonged survival and improved bone structure of lethal hypophosphatasia model mice by rAAV-mediated high dose expression of alkaline phosphatase

○Takahashi A^{1,3}, Ikeue R², Hirai Y³, Kasahara M¹

¹Dept Pharmacol, Tokyo Dent Coll

²Dept Crown Bridge Prosthodont, Tokyo Dent Coll

³Dept Biochem Mol Biol, Nippon Med Sch

Hypophosphatasia (HPP) is a systemic skeletal disease, caused by deficiency of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNALP). Although considerable amount of attention has been focused on the enzyme replacement therapy (ERT), repeated injection of large amounts of TNALP is required to achieve clinical benefits. As an alternative approach, we recently showed that survival of the lethal TNALP knockout (HPP) mice can be prolonged by recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector expressing TNALP. However, therapeutic effects on the abnormal bone structure by ERT or gene therapy have not yet been elucidated. In this study, to develop more effective and clinically applicable protocol, we assessed efficacy of high-dose ALP activity for full recovery of bone structure and evaluated safety of this serum ALP activity. We generated rAAV vector expressing bone-targeted TNALP, and injected into the quadriceps femoris muscle of newborn HPP mice. The treated HPP mice grew well when serum ALP activity levels were over 20 U/mL and survived over 3 months with healthy appearance. Improved mineralization in the knee joints of the 20U-ALP treated mice was demonstrated by X-ray images. Our data showed that rAAV induced the high dose of ALP-activity would be promising to treat the infantile of HPP.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-131 Mg, Ca 及び Zn で活性化されるヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ活性に対するエチドロネートの作用

○島田 英知¹, 鈴木 邦明², 吉村 善隆², 南川 元², 山崎 裕¹

¹北大 院歯 高齢者

²北大 院歯 細胞分子薬理

【目的】ヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性は Mg, Ca 及び Zn により独立して活性化される (Mg, Ca 及び Zn-ALP とする) が, それらに対するエチドロネート (etidronate) の作用は明らかではないので検討した. 【方法】CALZYME 社から購入したヒト骨型 ALP を用い, 基質としてパラニトロフェニルリン酸 (pNPP) またはピロリン酸 (Na-PPi) を使用して Mg, Ca 及び Zn-ALP 活性を測定した. 【結果と考察】1. 種々濃度の Mg, Ca, Zn 存在下で pNPP を基質とした Mg, Ca 及び Zn-ALP 活性は etidronate の濃度依存的に低下した. Etidronate による 50% 活性阻害濃度 ($K_i 0.5$) は存在する Mg 濃度が高いほど増加したが, Ca 及び Zn の濃度による顕著な $K_i 0.5$ の変化は認められなかった. Etidronate は Mg-ALP 活性では Mg との拮抗阻害を示すが, Ca 及び Zn-ALP 活性では Ca 及び Zn と拮抗しないことが示唆された. 一方, Na-PPi が基質の場合は, Mg の濃度が増加しても $K_i 0.5$ には顕著な影響はなく, etidronate は Mg とは拮抗せず活性を阻害すると示唆された. 2. Mg, Ca 及び Zn-ALP 活性の基質濃度依存性に対する etidronate の影響を調べた. pNPP が基質の場合は, Mg, Ca 及び Zn-ALP 活性は etidronate の濃度に依存して抑制されたが, etidronate の濃度が増加しても pNPP の 50% 活性化濃度 ($K 0.5$) には顕著な影響を示さず, etidronate は pNPP とは非拮抗的に ALP 活性を阻害すると示唆された. 一方, 基質が NaPPi の場合, Ca 及び Zn-ALP 活性では etidronate は NaPPi とは非拮抗的に ALP 活性を阻害すると示唆された. しかし, Mg-ALP 活性では etidronate 濃度に依存した ALP 活性の低下と Na-PPi に対する $K 0.5$ の減少, すなわち親和性の増加が観察された. 【結論】Etidronate は pNPP あるいは Na-PPi を基質としたヒト骨型 Mg, Ca 及び Zn-ALP 活性を濃度に依存して阻害したが, 阻害の機構は活性化される金属イオンと基質の種類によって異なることが示唆された.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

The effects of etidronate on human bone-type alkaline phosphatase activity activated by Mg, Ca or Zn

○Shimada H¹, Suzuki K², Yoshimura Y², Minamikawa H², Yamazaki Y¹

¹Dept Gerodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

²Dept Mol Cell Pharmacol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Objective: The effects of etidronate on human bone-type alkaline phosphatase (ALP) activity activated by Mg, Ca and Zn (Mg, Ca and Zn-ALP) were tested. Methods: We used commercial ALP (CALZYME) and p-nitrophenylphosphate (pNPP) or pyrophosphate (Na-PPi) as substrates. **Results and Discussion:** 1. Etidronate inhibited Mg-ALP activity competitively with Mg, but inhibited Ca and Zn-ALP activities noncompetitively with Ca and Zn, with pNPP as substrates. Whereas etidronate inhibited Mg-ALP activities noncompetitively with Mg with Na-PPi as substrates. 2. Then, we examined the effects of etidronate on substrate concentration-dependency of ALP activities. Etidronate inhibited Mg, Ca and Zn-ALP activities depending on its concentration noncompetitively with pNPP. Etidronate also inhibited Ca and Zn-ALP activities noncompetitively with Na-PPi. Whereas, in the case of Mg-ALP, etidronate inhibited Mg-ALP activity with increase in affinity for NaPPi. **Conclusion:** Etidronate inhibited human bone-type Mg, Ca and Zn-ALP activities depending on its concentration with pNPP or Na-PPi as substrates, but the inhibition mechanism may be different depending on activating divalent cations and the used substrates.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-132 *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS による Th17 細胞への分化誘導におけるカテプシン S の役割

○出来田雅人^{1,2}, 武 洲², 中西 博², 高橋 一郎¹

¹九大 院歯 矯正

²九大 院歯 口腔機能分子

【目的】 歯周病菌の *Porphyromonas gingivalis* (Pg) が糖尿病や動脈硬化など全身疾患の誘発や進展に関与することが報告されている。最近、私たちは二次リンパ組織である脾臓内の樹状細胞が産生するカテプシン S (CatS) 依存的に分化した Th1 細胞が神経障害性疼痛の慢性化において重要な役割を果たすことを報告した (J Neurosci, 2014)。そこで今回は、pgLPS 全身投与に伴う脾臓内の CD4 陽性細胞の分化ならびに CatS の役割について検討を行った。【方法】 PgLPS を 7 日間連続全身投与 (5 mg/kg/day, i.p.) を行い脾臓の解析を行った。【結果と考察】 野生型 DBA マウス (♀, 12 週齢) では脾臓肥大、樹状細胞 (CD11c 陽性) における CatS 発現増加ならびに Th17 細胞への分化が認められた。一方、CatS 欠損マウスにおいてはこのような変化は認められなかった。さらに、PgLPS は野生型マウスの脾臓より単離した樹状細胞において IL-6 ならびに IL-23 産生を誘導したが、CatS の特異的阻害剤 (Z-Phe-Leu-COCHO) 存在下では検出できなかった。また、CatS 欠損マウスの脾臓より単離した樹状細胞においても IL-6 ならびに IL-23 産生は認められなかった。以上の結果より、PgLPS の全身投与に伴い樹状細胞において増大した CatS は IL-6 ならびに IL-23 の産生を誘導することで、CD4 陽性 T の Th17 細胞への分化を誘導している可能性が示唆された。今後、CatS による IL-6 ならびに IL-23 の産生誘導メカニズムについて解明する予定である。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The role of Cathepsin S in Th17 cell differentiation by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide

○Dekita M^{1,2}, Wu Z², Nakanishi H², Takahashi I¹

¹Sect Orthod Dentofac Orthop, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Aging Sci Pharmacol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

It is widely accepted that periodontal bacteria of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) is involved in the induction and progression of systemic diseases such as diabetes and arteriosclerosis. Recently, we reported that the role of Cathepsin S in Th1 Cell-Dependent Transition of Nerve Injury-Induced Acute Pain to a Chronic Pain State (J Neurosci, 2014). So, we have studied the role of CatS in the differentiation of CD4-positive cells in the spleen due to pgLPS systemic administration. After PgLPS systemic administration for 7 days (5 mg/kg/day, ip), the wild-type DBA mice (female, 12 weeks old) spleen hypertrophy, CatS increased expression in dendritic cells (CD11c positive) and observed Th17 differentiation of the T cells. However, it was not observed such changes in the CatS -/- mice. Furthermore, PgLPS induced IL-6 and IL-23 production in isolated dendritic cells from the spleens of wild-type mice. But it could not be detected in the presence specific inhibitor of CatS. (Z-Phe-Leu-COCHO) and CatS -/-. Thus, CatS which is increased in dendritic cells with the systemic administration of PgLPS inducing the production of IL-6 and IL-23, so it is suggested the possibility that CatS induce differentiation into Th17 cells of the CD4-positive T cell.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-133 口腔癌細胞増殖抑制における抗体付着マイクロバブルと超音波との相乗作用

○平林 文香^{1,2}, 岩永賢二郎², 沖永 敏則¹, 有吉 渉¹, 西原 達次¹

¹九歯大 感染分子生物

²九歯大 顎顔面外科

【目的】 ソノポレーション法は、リポソームに超音波造影ガスを封入したマイクロバブル (MB) に超音波を照射することで、MB が破裂し細胞膜の透過性を亢進させるシステムである。このシステムを応用して、細胞内に遺伝子や薬剤を効率よく導入する方法の開発が進められている。最近、帝京大学薬学部は抗体を付着させた MB を開発し、ソノポレーション法に応用する方法を報告した。そこでわれわれは、同学部より提供を受けた抗 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 抗体を付着させた EGFR-MB を用い、EGFR 高発現ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株 (Ca9-22) における抗癌剤の効果増強を検討し、細胞の表面抗原をターゲットにした新たな選択的ドラッグデリバリーシステムの開発を目指した。**【材料および方法】** Ca9-22 へ pVIVO1-GFP/LacZ を導入し、X-gal 染色を用いて EGFR-MB を用いたソノポレーション法による導入効率を評価した。また、抗癌剤 Bleomycine (BLM) を用い、同法による抗癌剤の効果増強について検討した。細胞増殖抑制の評価には WST-8 アッセイ、細胞のアポトーシスの評価には Flow cytometry 解析および Hoechst 染色を用いた。**【結果】** EGFR-MB を用いたソノポレーション法では、pVIVO1-GFP/LacZ の導入効率がコントロールに比べて有意に高かった。また、より低濃度の BLM で著明な癌細胞増殖抑制効果が得られ、癌細胞にアポトーシスが誘導されていることを確認した。**【結論】** ソノポレーション法に EGFR-MB を応用することにより、効率よく遺伝子や抗癌剤を導入することが可能であることが明らかとなり、本手法は新たな癌特異的抗癌治療となり得る可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Mechanism of tumor suppression by sonoporation: Synergistic effects of antibody-conjugated microbubble and ultrasound in oral cell carcinoma

○Hirabayashi F^{1,2}, Iwanaga K², Okinaga T¹, Ariyoshi W¹, Nishihara T¹

¹Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ

²Div Oral Maxillofac Surg, Kyushu Dent Univ

Purpose: Ultrasound creates transient permeability of cell membranes in the presence of microbubbles (MBs), and foreign molecules can easily enter cells, which is known as 'sonoporation'. We collaborated with Faculty of Pharma-sciences, Teikyo University. We developed anti-Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) antibody conjugated MBs (EGFR-MB). In the present study, we examined the effect of EGFR-MB on oral squamous cell carcinoma. **Materials & Methods:** Ca9-22, a human gingival carcinoma cell line, was used throughout this study. MBs were conjugated with an anti-EGFR antibody, and were entrapped ultrasound contrast gas. Ca9-22 cells were exposed to ultrasound with EGFR-MB and anti-cancer drug bleomycin (BLM). We elucidated the cell viability and detected apoptotic cells using WST-8 assay, FACS and Hoechst staining. **Results:** EGFR-MB treatment significantly enhanced transformation efficiency in Ca9-22 cells. Sonoporation and EGFR-MB had a strong cytotoxic effect on Ca9-22 cells at the low dose of BLM. In addition, sonoporation and EGFR-MB remarkably increased the population of apoptotic cells even at a low dose BLM. **Conclusion:** Treatment with EGFR-MB and ultrasound make it possible to administer drugs into the cells more efficiently and specifically, suggesting a novel application for chemotherapy treatment for oral squamous cell carcinoma.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-134 破骨細胞分化はラクトフェリンにより直接的に減弱される

○吉村 善隆¹, 加藤 展教^{1,2}, 南川 元¹, 鈴木 邦明¹, 山崎 裕²

¹北大 院歯 細胞分子薬理

²北大 院歯 高齢者

【目的】ラクトフェリンは、生体内に元来存在し、抗菌作用など多くの働きを持つ物質である。近年、ラクトフェリンが骨芽細胞に作用し、破骨細胞分化を抑制することが報告されているが、ラクトフェリンが直接的に破骨細胞の分化誘導に与える影響に関して報告はない。今回、破骨細胞分化におけるラクトフェリンの直接的な影響を検討した。【材料と方法】RANKL 添加培養液を用いて RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化過程において、ウシラクトフェリンの濃度依存的、添加日数依存的の総破骨細胞（2 核以上）数、小型破骨細胞（2~7 核）数および巨大破骨細胞（8 核以上）数を測定した。また、ラクトフェリン添加後の破骨細胞関連遺伝子 mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。【結果と考察】ラクトフェリンの濃度依存的に総破骨細胞数、小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数は減少し、多核化も抑制された。ラクトフェリン添加日数の場合分けでは、培養 1 日目にラクトフェリンを添加した場合は全て、破骨細胞数の減少と多核化の抑制、吸収窩の減少が観察された。ラクトフェリンは RANKL 無添加の RAW264.7 細胞に対して影響を与えなかった。ラクトフェリンが破骨細胞の分化誘導に影響を及ぼすのは RANKL 添加後 48 時間以内であることが示唆されたので、破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で計測した結果、破骨細胞のマスタースイッチである NFATc1、マーカー遺伝子である RANK、破骨細胞の融合因子である DC-STAMP および OC-STAMP の発現量が減少していた。以上の結果より、ラクトフェリンは RANKL 添加後 48 時間以内に作用させた場合、破骨細胞関連遺伝子の発現が抑制し、直接的に破骨細胞の分化誘導を抑制することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Osteoclast differentiation is directly downregulated by lactoferrin

○Yoshimura Y¹, Kato H^{1,2}, Minamikawa H¹, Suzuki K¹, Yamazaki Y²

¹Dept Mol Cell Pharmacol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

²Dept Gerodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Recent research has shown that lactoferrin indirectly downregulates osteoclast differentiation by affecting osteoblasts. However, the mechanism by which lactoferrin directly affects osteoclast differentiation has not been reported. Therefore, this study was to examine the direct effects of lactoferrin on RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW 264.7 cells. The effect of lactoferrin on the number of osteoclasts was measured, and the effect on the mRNA expression of osteoclast differentiation markers was assayed using real-time PCR. Lactoferrin decreased the number of osteoclasts (≥ 2 nuclei) and large osteoclasts (≥ 8 nuclei) in a dose-dependent manner without affecting the viability of RAW 264.7 cells. In addition, lactoferrin only mediated these effects within 48 h of the beginning of culturing the RAW 264.7 cells with RANKL. Lactoferrin also significantly inhibited RANKL-induced mRNA expression of osteoclastic differentiation genes such as NFATc1, RANK, DC-STAMP and OC-STAMP. These findings suggest that lactoferrin directly downregulates osteoclast differentiation within 48 h of the beginning of culturing the RAW 264.7 cells with RANKL.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-135 レミフェンタニルの投与が兎の内頸動脈血流量と口腔組織血流量の変化に及ぼす影響

○平田 淳司¹, 笠原 正貴², 一戸 達也³

¹東歯大 院歯 麻酔

²東歯大 薬理

³東歯大 麻酔

【背景・目的】口腔外科手術では血流の豊富な粘膜や骨髄が術野となるため、術中出血の制御が重要となる。術中出血量の制御の目的で低血圧麻酔を施行した報告があるが、脳障害などの合併症の存在も報告されている。セボフルラン麻酔下の日本白色種系家兎では、超短時間作用性のオピオイド鎮痛薬であるレミフェンタニルは総頸動脈血流量を変化させずに口腔組織血流量を有意に減少させた。また、プロポフォール/レミフェンタニル麻酔下において、唾液分泌量が増加した。このことから、レミフェンタニル投与によって内頸動脈血流量が増加したり、口腔組織の血流再分布が起きた可能性が示唆される。今回我々は、レミフェンタニルが内頸動脈血流量と口腔組織血流量に与える影響を調べるために、総頸・内頸・外頸動脈血流量を観察すると同時に、咬筋、下顎骨骨髓や舌粘膜に加えて、顎下腺組織血流量を観察した。【方法】日本白色家兎雄 12羽を対象にセボフルランで麻酔維持を行い、レミフェンタニルの投与速度 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (γ), 0.4 γ の条件下で循環動態パラメータや総頸・内頸・外頸動脈血流量、咬筋、下顎骨骨髓、顎下腺、舌粘膜の口腔組織血流量を測定した。【結果】レミフェンタニルの投与速度依存性に総頸・外頸動脈血流量は減少傾向を示したが内頸動脈血流量は変化しなかった。各口腔組織血流量は投与速度依存性に有意に減少した。レミフェンタニル 0.2 γ 時には各口腔組織血流量の減少率はいずれも 15%程度であったのに対し、投与速度 0.4 γ 時では咬筋血流量が 31%、下顎骨骨髓血流量が 38%、顎下腺血流量が 25%の減少率となり、投与速度が増加すると口腔組織血流量の減少率に差が生じた。考察)レミフェンタニル投与時には総頸・外頸動脈血流量が有意な減少を認めず、内頸動脈血流量は一定であったことから、口腔顎顔面領域において血流の再分布が生じている可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of remifentanil on internal carotid artery blood flow and oral tissue blood flow during sevoflurane anesthesia in rabbits

○Hirata A¹, Kasahara M², Ichinohe T³

¹Dept Dent Anesthesiol, Tokyo Dent Coll Grad Sch Dent

²Dept Pharmacol, Tokyo Dent Coll

³Dept Dent Anesthesiol, Tokyo Dent Coll

Purpose: The aim of this study was to investigate the effect of remifentanil continuous infusion on the oral tissue blood flow and internal carotid artery blood flow in rabbits. **Materials & Methods:** Twelve male tracheotomized Japan White rabbits were anesthetized with sevoflurane under mechanical ventilation. The infusion of remifentanil was 0.2 and then 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ for 20 minutes. Observed variables were circulatory dynamics, common, internal and external carotid artery blood flow (CCBF, ICBF, ECBF) and oral tissue blood flow. **Results:** Circulatory dynamics and oral tissue blood flow showed dose-dependent decreases during remifentanil infusion with sevoflurane anesthesia. CCBF and ECBF showed a tendency to decrease, whereas ICBF did not change. At the infusion rate of 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, each oral tissue blood flow decreased similarly. In contrast, in the case of 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, decrease in blood flow in the mandibular bone marrow was larger than that of submandibular gland. **Discussion:** It is suggested that remifentanil produce redistribution of blood flow in oral maxillofacial region.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-136 ラットエナメル芽細胞とマウス骨芽細胞の分化誘導に対するリコンビナント・ヒトアメロジェニンの作用

○高橋亜友美¹, 森田 貴雄², 村田 佳織¹, 齊藤 正人¹, 谷村 明彦²

¹北医療大 歯 小児歯

²北医療大 歯 薬理

【目的】 アメロジェニンはエナメル質形成時に大量に分泌され、石灰化とともに分解・除去されることが知られている。また、間葉系の細胞増殖・分化におけるシグナル分子としての作用も報告されているが、詳しいメカニズムは解明されていない。本研究ではアメロジェニンの分化誘導能を明らかにすることを目的に、ラットエナメル芽細胞(HAT-7細胞)とマウス骨芽細胞(MC3T3-E1細胞)に対するリコンビナント・ヒトアメロジェニンの作用を解析した。【方法】 ヒトアメロジェニン発現プラスミドベクターをタンパク質発現用哺乳類浮遊細胞に導入後、DDKアガロースビーズを用いて精製し、純度を確認した。細胞分化の指標として、アリザリンレッドS染色とALPアッセイを行った。また細胞伸展能を調べるため、DIOC6とDAPIで蛍光染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、細胞接着面の面積と細胞数をNIS-Elements(Nikon)を用いて評価した。【結果と考察】 DDKアガロースビーズで精製したサンプルのウエスタンブロッティングとタンパク質染色にて27kDaおよび54kDaのバンドが認められたことから、高純度のアメロジェニンが精製されたことが示された。アメロジェニンはHAT-7細胞のALP活性を増加させた(4μg/mL<)のに対し、MC3T3-E1細胞のALP活性を低下させた。このことから分化誘導に対するアメロジェニン作用が、細胞の種類によって異なることが示唆された。またアメロジェニンによってMC3T3-E1細胞の細胞接着面の面積が、コントロール(BSA)と比較して約2倍に増大したことから、アメロジェニンが細胞接着性を持つことが示唆された。【結論】 リコンビナント・ヒトアメロジェニンはHAT-7細胞、MC3T3-E1細胞それぞれに対し異なる分化誘導能をもち、また細胞接着能を有するタンパクであることが明らかとなった。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effects of recombinant human amelogenin on the differentiation of rat ameloblast cells and mouse osteoblastic cells

○Takahashi A¹, Morita T², Murata K¹, Saitoh M¹, Tanimura A²

¹Div Pediatr Dent, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

²Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Amelogenin is the major secretory product of ameloblast in the developing teeth and plays crucial roles for the enamel mineralization. Recent evidence also suggests biological activities of amelogenin for the cell differentiation of dental epithelial and mesenchymal cells. The present study demonstrates effects of amelogenin on the differentiation and cell adhesion. In the present study, we expressed recombinant human amelogenin in EXPI cells, and purified it by DDK beads. Western blotting with anti-amelogenin antibody and the protein staining with silver stain and MemCode stain kit showed two bands at the molecular mass of 27kDa and 54kDa of the purified amelogenin. Amelogenin (4 μg/mL<) increased ALP activity in the HAT-7 cells, suggesting the enhanced cell differentiation in this cell type. Interestingly, however, same concentrations of amelogenin decreased ALP activity in MC3T3-E1 cells. These results indicate that amelogenin has different ability in the differentiation of HAT-7 cells and MC3T3-E1 cells. We also studied cell adhesive activity of amelogenin using a confocal laser scanning microscopy and found that the area of the cell adhesion in the MC3T3-E1 cells was approximately 2-times on amelogenin-coated glass than that on control (BSA-coated) glass. These results suggest the cell adhesive activity of amelogenin.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-137 矯正治療に伴う疼痛に対する新規疼痛制御物質の探索

○長谷川尚哉¹, 佐々木 会¹, 土屋 隆子¹, 坂上 宏², 安達 一典², 須田 直人¹

¹明海大 歯 形態機能成育 矯正

²明海大 歯 病態診断治療 薬理

【目的】これまで我々は、ラットに負荷した矯正力が、電気刺激で誘発される開口反射誘発閾値 (TH) を矯正力負荷 1~3 日後まで有意に低下させることを報告した。そこで、既存の鎮痛薬ならびに TRPV1 受容体拮抗薬 (A-889425) の鎮痛効果を歯の移動量と併せて検討した。【材料および方法】Wistar 系雄性ラットの上顎両側門歯と上顎右側第一臼歯 (M1) 間に Ni-Ti コイルスプリングを装着し、矯正力を負荷した。その後、vehicle, アスピリン (25, 50, 100 mg/kg/day), アセトアミノフェン (100 mg/kg/day), A-889425 (1.25, 2.5, 5.0 μ mol/kg/day) を腹腔内投与 (3 回/day) した。矯正力負荷 1 日後に全身麻酔下のもと筋電図 (顎二腹筋) 採取用ワイヤーと、電気刺激用電極を両側 M1 部歯肉に留置した。歯の移動側である右側と対照側である左側 M1 部刺激時の TH を比較し、各薬物の鎮痛効果を評価した。歯の移動量は、上顎のシリコン印象から石膏模型を作製し測定した。【結果】Vehicle 投与群では、対照側と比較して移動側の TH が有意 ($P < 0.05$) に低下した。100 mg/kg のアスピリンの投与、あるいは、5.0 μ mol/kg の A-889425 の投与は、移動側の TH の低下を有意 ($P < 0.05$) に抑制した。アセトアミノフェンの投与は、vehicle 投与群と比較してこのような TH の低下に影響を与えなかった。矯正力負荷 1 日後の歯の移動量は、いずれの薬物の投与によっても有意な影響を受けなかった。【考察】本モデルを用いた検討より、歯の移動に伴う疼痛の緩和にはアスピリンが有効であるが、アセトアミノフェンは奏効しない可能性が考えられる。また、A-889425 も鎮痛効果を発現したことから、TRPV1 受容体が歯の移動に伴う疼痛制御に有効な標的であることが示唆された。シクロオキシゲナーゼならびに TRPV1 受容体は破骨細胞活性を制御することが知られてきた。今後は、投与期間を延長し歯の移動量ならびに多核破骨細胞浸潤への影響をさらに検討する必要がある。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Search for new pain control material for t orthodontic treatment-induced pain

○Hasegawa N¹, Sasaki A¹, Tsuchiya T¹, Sakagami H², Adachi K², Suda N¹

¹Div Orthod Dept Human Dev Foster, Meikai Univ Sch Dent

²Div Pharmacol Dept Diagn Ther Sci, Meikai Univ Sch Dent

Recently, we have reported that the jaw-opening reflex (JOR) excitability is increased in 1-3 days and is decreased in 7 days after orthodontic force application in rats. The aim of this study was comparison of analgesic effect of common analgesics (aspirin and acetaminophen) and TRPV1 antagonist on the orthodontic pain in rats. In this model, general anesthetized rats were applied continuous orthodontic force by Ti-Ni coil spring to only right maxillary first molar. Aspirin (25, 50 and 100 mg/kg/day), acetaminophen (100 mg/kg/day), A-889425 (1.25, 2.5, 5.0 μ mol/kg/day) and vehicle (CMC) were repetitively administrated (i.p., 3 times/day) from immediately after orthodontic force application. In comparison with vehicle, aspirin (100 mg/kg) and A-889425 (5.0 μ mol/kg) significantly increased the right side JOR threshold. At D1, any treatments did not alter of the tooth movement. These data suggest that both NSAIDs and TRPV1 receptor antagonist are able to reduce orthodontic pain, however, both agents are known as mediators of osteoclast differentiation. Further studies to investigate the effects of prolongation of drug, in particular A-889425, treatment period on morphological alterations (e.g., tooth movement and expression of mature osteoclasts) and physiological features are required.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-138 ラット歯原性上皮細胞の分化とマイグレーションにおけるカルシウム応答の解析

○村田 佳織¹, 福本 敏³, 森田 貴雄², 高橋亜友美¹, 齊藤 正人¹, 谷村 明彦²

¹北医療大 歯 小児歯

²北医療大 歯 薬理

³東北大 院歯 小児歯

【目的】カルシウムは多くの細胞において重要なセカンドメッセンジャーであり、分化やマイグレーションなどの様々な細胞の機能調節を行う。ストア作動性カルシウム流入 (SOCE) の制御分子である Stim1 や Orai1 の不全がエナメル質形成不全を起こすことから、SOCE がエナメル質形成において重要な役割を担っている可能性が考えられる。本研究は、ラット歯原性上皮細胞 (SF2) の分化とマイグレーションにおける SOCE の役割を明らかにするために、長時間ライブセルイメージング解析を行った。

【材料と方法】カルシウムセンサータンパクの G-GECO と YC-Nano50 はアデノウイルスベクターを用いて SF2 細胞に導入し、培養条件下で長時間ライブセルイメージング観察を行った。また、全反射照明装置 (TIRF) を用いて、細胞底面の細胞内カルシウム濃度の変化と、細胞のマイグレーションの観察を行った。

【結果と考察】SF2 細胞は培養条件下で自発的で間欠的な細胞内カルシウム濃度の上昇を起こした。この自発的カルシウム応答は細胞内ストアからのカルシウム放出による反応であると考えられた。SF2 細胞を血清存在下もしくは上皮成長因子 (EGF) とケモカイン (CXCL12) 存在下で培養するとマイグレーションの増加を示した。SOCE 阻害剤の LaCl₃ は、血清依存性のマイグレーションを阻害したが、EGF と CXCL12 依存性のマイグレーションは阻害しなかった。TIRF 観察では細胞突起の運動が観察され、LaCl₃ の添加により、その突起の運動性の低下やカルシウム濃度の低下が認められた。これらの結果から SOCE はエナメル質形成過程における細胞のマイグレーションに関与している可能性が示唆された。現在、SF2 細胞の分化誘導とカルシウムシグナルの解析を行っている。

【結論】SOCE を介するカルシウム流入が SF2 細胞のマイグレーションに関与することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Analysis of the calcium responses in differentiation and migration of rat dental epithelial cells

○Murata K¹, Fukumoto S³, Morita T², Takahashi A¹, Saitoh M¹, Tanimura A²

¹Div Pediatr Dent, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

²Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

³Div Ped Dent, Dept Oral Health Dev Sci, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Ca²⁺ signals are essential second messengers in a wide range of biological processes, including cell differentiations and migrations. Recent studies have shown that the deficiency of the store-operated calcium entry (SOCE) causes amelogenesis imperfecta. These findings suggest the important roles of SOCE on amelogenesis. To examine the roles of SOCE on cell differentiation and migration, we visualizing Ca²⁺ responses in dental epithelial cell line SF2 cells using gene encoded calcium indicators, G-GECO and YC-Nano50.

SF2 cells showed intermittent rises in intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) with the long time live-cell-imaging in a cell culture condition. These intermittent rises in [Ca²⁺]_i were inhibited by the combination of SERCA inhibitor and SOCE inhibitor (LaCl₃). SF2 cells showed a potentiated migration in the presence of serum, and this serum-dependent cell migration was inhibited by LaCl₃ almost completely. We also found that LaCl₃ reduced [Ca²⁺]_i and decreased the movement of cell projections. These results indicate crucial roles of SOCE on the serum-dependent cell migration of SF2 cells. Although EGF plus CXCL12 potentiated the migration of SF2 cells in the absence of serum, LaCl₃ had no effect on this migration. Currently, we are trying to analyze Ca²⁺ responses during the differentiation of SF2 cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-139 皮膚と口腔粘膜におけるフィラグリンの発現様式および分解過程

○有田 晴一¹, 八田 光世², 笠 孝成¹, 坂上 竜資¹, 山崎 純²

¹福歯大 口腔治療 歯周

²福歯大 細胞分子生物 分子機能

上皮バリア機能の維持は健全な歯周組織の恒常性を維持するために必須である。皮膚においては、顆粒層でプロフィラグリンがフィラグリン単量体に分解された後、ケラチンパターンが角化層下部において形成される。その後、フィラグリンは主にペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) 1 によるシトルリン化を受けた後で遊離アミノ酸へと分解される。しかし、口腔粘膜上皮のバリア構造におけるフィラグリンの役割については未だ十分に解明されていない。本研究では、ラットの皮膚、口蓋ならびに頬粘膜上皮におけるフィラグリンとその分解産物の発現様式を比較した。ラットから採取した組織切片はフィラグリン、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD1) 及びシトルリン化タンパク質に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。また、抽出タンパクは一次元もしくは二次元電気泳動後のウエスタンブロットにて解析した。蛍光免疫染色により、フィラグリンは皮膚の顆粒層から角化層下部にその局在を多く認めたが、口腔粘膜においては発現が少なかった。PAD1 ならびにシトルリン化タンパク質は皮膚でその局在を認めたが、口腔粘膜ではほとんど発現を認めなかった。ウエスタンブロットにより、皮膚でフィラグリンモノマーの分解産物が見られたが、口蓋では分解産物は見られなかった。また、頬粘膜ではプロフィラグリンのみが検出された。二次元電気泳動後のイムノブロットによって皮膚においてシトルリン化されたフィラグリンの存在が確認できた。以上の結果から、皮膚と口腔粘膜におけるフィラグリン分解過程の差異は PAD1 及びそのシトルリン化の違いによる可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Filaggrin expression and degradation process in the skin and the oral mucosa

○Arita S¹, Hatta M², Ryu T¹, Sakagami R¹, Yamazaki J²

¹Div Periodontol, Fukuoka Dent Coll

²Div Cell Mol Regul, Fukuoka Dent Coll

The epithelial barrier function is essential for maintenance of healthy periodontal homeostasis. Profilaggrin is produced in granular cells, and is then cleaved into filaggrin monomers, which produce the keratin pattern in the lower cornified layer. After citrullinated mainly by peptidyl arginine deiminase (PAD) 1, the monomers are degraded into the free amino acids in skin. However, the role of filaggrin in the oral epithelial barrier is still elusive. In this study, we compared the expression of filaggrin and its degradation products in the epithelium of skin, palate and buccal mucosa of rats. Immunofluorescence showed that filaggrin is expressed in the granular and the lower cornified layer of the skin intensively, and less in the oral mucosa. PAD1 and citrullinated protein were highly expressed in skin, but not in the oral mucosa. Immunoblotting showed that degradation products of filaggrin monomers were detected in the skin, but not in the palate. Only profilaggrin was seen in the buccal mucosa. Two-dimensional gel electrophoresis confirmed the presence of citrullinated filaggrin in the skin. These results suggest that the different patterns of filaggrin degradation are associated with differences in PAD1-mediated filaggrin citrullination in the skin and oral mucosa.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-140 RANKL 結合ペプチド(OP3-4)の注射投与は、BMP-2により誘導されるマウス上顎の骨造成を促進する

○上原 智己¹, 田村 幸彦², 宮新美智世¹, 青木 和広²

¹医科歯科大 院医歯 小児歯

²医科歯科大 院医歯 硬組織薬理

口唇口蓋裂等の先天的な顎骨欠損を伴う症例や、顎堤が吸収し補綴治療が困難な症例に対し、顎骨を造成する治療は有用である。bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) の骨形成作用は広く知られているが、骨形成に必要な BMP-2 の高用量使用が、炎症の発現や発がんリスクの上昇などを引き起こすことが報告されている。そこで我々は、骨形成に必要な BMP-2 の量を減らす薬剤候補として、骨芽細胞上の receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) に結合する、RANKL 結合ペプチドを開発してきた。また、従来の顎骨造成は切開や縫合等の侵襲性の高い外科処置を伴うため、低侵襲性の治療が望まれている。本研究の目的は、RANKL 結合ペプチドの1つである OP3-4 ペプチド(OP3-4)によって、BMP-2 の骨形成作用の促進へ与えられる影響と、薬剤の注射投与によるマウスの顎骨造成の可否を明らかにすることである。実験方法としては、OP3-4 と BMP-2 を含ませた粒子状ゼラチンハイドロゲル担体を、マウス上顎の切歯と第一大臼歯の間の歯隙に骨膜下注射した。術後 28 日目に、BMP-2 単独群と比べて骨塩量・骨密度の有意な上昇を伴う明らかな骨造成が認められた。蛍光ラベリング観察の結果、造骨部位の石灰化は外側が先に、内側が後に生じることが示唆された。さらに、OP3-4 は骨形成の初期過程に関与し、術後 7 日目において BrdU(+) の細胞数を上昇させ、術後 10 日目において *Runx2* と *Colla1* の発現を上昇させることが明らかとなった。本研究結果は RANKL 結合ペプチドである OP3-4 が BMP-2 の有する骨形成作用を促進することを示した初めての研究報告であり、簡便かつ低侵襲に顎骨造成を行う革新的な技術開発へとつながる可能性を示している。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Injection of RANKL-binding peptide OP3-4 promotes BMP-2-induced maxilla augmentation in mice

○Uehara T¹, Tamura Y², Miyashin M¹, Aoki K²

¹Div Pediatr Dent, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Div Pharmacol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

High-dose-treatment of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) is necessary to induce osteogenesis, however, this treatment regimen is associated with adverse effects, including inflammation and carcinogenesis. The supplementation of other bone-augmenting agents is considered helpful for preventing such side effects by reducing the amount of BMP-2 required to obtain a sufficient amount of bone. The purpose of this study is to examine the feasibility of administering receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-binding peptide OP3-4 as a potential bone-augmenting agent using an injectable gelatin hydrogel (GH) carrier. The GH carrier containing OP3-4 with BMP-2 was subperiosteally injected into the murine maxillary right diastema between the incisor and the first molar. After 28 days, the higher bone mineral density and content of local bone formation was observed compared to the GH containing BMP-2 group. Fluorescent labeling revealed that the mineralization outside the newly formed bone occurred prior to that in the inner region. Furthermore, OP3-4 increased the BrdU-positive cell number on day 7 and the *Runx2* and *Colla1* expressions on day 10. In conclusion, we demonstrated, for the first time, that the injection of OP3-4 promoted BMP-2-induced osteogenesis, which could thus become an effective and noninvasive means of alveolar bone augmentation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P1-141 口腔乾燥治療薬の継続服用による有効性の検討

○小野 瞳, 井階 一樹, 阪井 丘芳

阪大 院歯 顎治

【目的】口腔乾燥患者に対しムスカリン受容体刺激薬ピロカルピン塩酸塩(以下ピロカルピン)を推奨量服用すると、発汗や嘔気などの副作用が発現し治療継続が困難となる場合がある。当院では副作用軽減を目的に投与量を少量から開始する方法を採用しており、今回投与量およびパターンを検証する目的で、有効性と安全性を後方視的に検討した。さらに、ピロカルピン継続服用の有効性と機序を検討するため、マウスによる分子生物学的解析を行ったので併せて報告する。【方法】2011年からの4年間に大阪大学歯学部附属病院ドライマウス外来にてピロカルピンによる服用治療を行ったシェーグレン患者について診療録を参考に患者背景・服用量・副作用・サクソントンテストによる唾液分泌量・VASを調査した。ICRマウスにピロカルピンを2週間経口投与し、唾液分泌に対する反復経口投与の効果および唾液腺組織の唾液腺マーカーと前駆細胞マーカーの発現比較を行った。【結果】症例は20例(男:女=3:17)で、6例は副作用の出現などにより服用中止となったが、14例では10か月間の服用が可能であった。平均服用量は 5.25 ± 1.3 mg/日であり推奨される用量より少なかった。また服用量の減少に伴う唾液分泌量や自覚症状の悪化はすべての症例で認めなかった。またマウスの実験では、ピロカルピンを反復投与すると単回投与と比べて唾液分泌量が有意に増加しており、唾液腺マーカーおよび前駆細胞マーカーの発現増加を認めた。【考察】推奨量より少ないピロカルピン服用量で唾液分泌能や自覚症状の緩和が保たれており、服用量を調整することがQOLに寄与している可能性があると考えられた。動物実験により唾液分泌量の維持には反復投与が重要で、唾液腺前駆細胞の活性化が示唆された。以上の結果からピロカルピンは、患者に合わせた適切な量を設定し継続することが有効であり、前駆細胞の活性化に寄与している可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The effectiveness of pilocarpine for dry mouth patients -long-term medication for human and mouse -

○Ono H, Ikai K, Sakai T

Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

Pilocarpine is the representative drug for the treatment of dry mouth symptoms of Sjogren's syndrome. However, because of the side effects, it is difficult to continue treatments at times. The subjects were to determine the effectiveness and safety of pilocarpine for patients. Our findings is that the salivation ability and subjective symptoms was kept with pilocarpine doses within quantity of administration, as observed by the Saxon test and the average on the Visual Analogue Scale. In addition, by using mice that take pilocarpine, we demonstrate that the effectiveness and mechanism of the pilocarpine continuation by molecular biological analysis. To analyze the effective of pilocarpine for salivary gland in mice, embryonic stem cell markers and salivary gland markers were used for qPCR and for western blotting analysis. And, the repetition dosage was important to maintenance of the quantity of salivation, and the experiments suggest that the activation of the stem cell. The above results show that the treatment of dry mouth symptoms of Sjogren's syndrome were more effective using the method of adjusted and long-term medication.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-1 組織透明化によるマウス三叉神経中脳路核回路の三次元解析

○山口 留奈¹, 吉村 成美¹, 千堂 良造^{1,2}, 倉本恵梨子¹, 岩井 治樹¹, 山中 淳之¹, 豊留宗一郎^{1,2}, 後藤 哲哉¹

¹鹿大 院医歯 機能形態

²鹿大 院医歯 歯科麻酔全身管理

³鹿大 院医歯 顎顔面外科

【目的】三叉神経中脳路核は咬筋の筋紡錘や歯根膜等からの感覚情報を受け、脳幹を中心とした様々な脳領域に軸索投射することが知られている。しかし、個々の中脳路核ニューロンがこれらの感覚をどのように受容し、それぞれの情報をどの脳領域へ出力するのか、その詳細は不明である。そこで本研究では、逆行性トレーサー法と組織透明化を組み合わせ、三叉神経中脳路核ニューロンの入出力回路と細胞体の三次元的局在の関係を明らかにすることを目的とした。【方法】マウスの咬筋と歯根膜のそれぞれに異なる逆行性トレーサー (Fluorogold, Fluoro Ruby, Fast Blue など) を注入し、一週間後にマウスを灌流固定、脳幹を取り出した。中脳路核を含む領域を厚さ 500 μm で切り出し、トレーサーに対する免疫染色、蛍光 Nissl 染色を行った後、Advanced CUBIC 法、または Sca/eS 法により透明化した。その後、共焦点レーザー顕微鏡で撮影および三次元解析を行った。【結果と考察】マウス脳幹の組織透明化について、Advanced CUBIC 法と Sca/eS 法を比較した。CUBIC 法は使用する液が 2 種類と少なく簡便で、500 μm の厚さの脳幹においても比較的早く、高い透明性が得られた。Sca/eS 法は、CUBIC 法と比較して煩雑であり、大脳皮質の透明化には成功したものの、脳幹では完全な透明化が得られなかった。従って、脳幹の透明化には、CUBIC 法が適していることが明らかになった。通常であれば、数十枚の切片をつなぎ合わせる再構築が必要となるところ、透明化法を用いることで、500 μm の切片 1 枚で三次元解析が可能となった。咬筋と歯根膜のそれぞれに異なるトレーサーを注入したところ、中脳路核において多数の大型ニューロンが逆行性に標識され、組織透明化を組み合わせることで、中脳路核の吻内側領域には筋紡錘の、尾外側領域には歯根膜の感覚ニューロンが局在することが、三次元的に明確に示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Three-dimensional analysis of arrangement and connections of mouse mesencephalic trigeminal neurons using brain-clearing techniques

○Yamaguchi R¹, Yoshimura N¹, Sendo R^{1,2}, Kuramoto E¹, Iwai H¹, Yamanaka A¹, Toyodome S^{1,2}, Goto T¹

¹Dept Anat Oral Sci, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Dept Dent Anesthesiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

³Dept Oral Maxillofac Surg, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

The mesencephalic trigeminal nucleus (MTN) has been known to receive sensory inputs from the muscle spindles mainly in the masticatory muscles, and the periodontal ligaments (PDL). To clarify the functions of MTN neurons, the precise topographic distribution of MTN neurons should be elucidated. Thus, we analyzed the relationship between three-dimensional distribution of cell bodies and input-output organization of mouse MTN neurons at a single neuron level using a combination of brain-clearing techniques and double retrograde labelings. For the transparency of 500- μm -thick parasagittal sections of fixed mouse brain stem, sections were treated using advanced CUBIC and Sca/eS. Treatment by CUBIC easily caused a high-transparency, whereas with Sca/eS samples were less transparent. These results indicated that CUBIC was better method for the transparency of the brain stem, including the MTN. Furthermore, a combination of CUBIC and double-fluorescent retrograde labeling technique clearly revealed that neurons innervating the masticatory muscles and PDL were distributed mainly in the rostromedial and caudolateral parts of the MTN, respectively. Eventually we found the precise three-dimensional distribution of MTN neurons receiving sensory inputs from the muscle spindles or PDL, which would provide crucial information for the clarification of neural circuit between MTN and other brain regions.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-2 *Fusobacterium nucleatum* によるヒト好中球からの neutrophil extracellular traps 誘導

○沼崎 研人¹, 西岡 貴志², 松下 健二³, 多田 浩之¹

¹東北大 院歯 口腔微生物

²東北大 院歯 口診

³長寿セ 口腔疾患

【緒言】好中球は、細菌および菌体成分の刺激に応じて neutrophil extracellular traps (NETs) を放出する。NETs は好中球に存在するヒストン、DNA、好中球エラスターゼや抗菌タンパクが結合した網状構造物であり、自然免疫における好中球による感染防御機構の一つである。しかしながら、歯周病における NETs の役割は十分に明らかにされていない。本研究では、歯周病関連細菌の一種であり、近年では口腔常在細菌と示唆されている *Fusobacterium nucleatum* による好中球からの NETs 放出機構について検討した。【方法】ヒト前骨髄球細胞株 HL-60 を 10 μ M レチノイン酸含有 RPMI 1640 培地で 4 日間処理した。好中球様細胞への分化誘導は、ギムザ染色による形態観察ならびに CD11b 発現をフローサイトメトリー法により確認した。*F. nucleatum* ATCC 25586 を tryptic soy broth にて嫌気培養し供試した。HL-60 細胞を *F. nucleatum* 生菌ならびに陽性対照の PMA で刺激後、NETs に含まれるヒストン H3 ならびにシトルリン化ヒストン H3 発現をウェスタンブロット法で検出した。また、細胞外の NETs に含まれる DNA を SYTOX Green 蛍光染色により観察した。【結果】ATRA 処理 HL-60 細胞を *F. nucleatum* で 4 時間刺激すると、培養上清中のヒストン H3 発現が著明に亢進し、細胞外 DNA 蛍光染色により網状構造物が観察された。また、*F. nucleatum* 刺激により HL-60 細胞のシトルリン化ヒストン H3 発現が亢進したことから、同刺激によりヒストン脱イミノ化が活性化されることが示唆された。【考察】*F. nucleatum* 刺激により好中球から NETs が放出されることが示された。口腔細菌による NETs 放出と歯周病病態との関連性について今後検討する予定である。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Fusobacterium nucleatum-induced production of neutrophil extracellular traps by human neutrophils

○Numazaki K¹, Nishioka T², Matsushita K³, Tada H¹

¹Div Oral Microbiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Div Oral Diag, Tohoku Univ Grad Sch Dent

³Dept Oral Dis Res, NCGG

Objective: Neutrophil extracellular traps (NET) are extracellular web-like DNA structures, which contain bactericidal substances, such as histone, human neutrophil elastase, and cathelicidin antimicrobial peptide. We examined the effects of *Fusobacterium nucleatum* on the induction of NET production in human neutrophils. **Methods:** HL-60 cells, a human leukemia cell line, were cultured in RPMI 1640 medium with 8% FBS. The cells were induced to differentiate into granulocytes by treating them with all-trans retinoic acid (ATRA). *F. nucleatum* ATCC 25586 was cultured anaerobically in tryptic soy broth. After being stimulated with the bacteria, the HL-60 cells were incubated with DNase I to release of NET. The expression levels of histone H3 in the culture supernatant and citrullinated histone H3 in the cell lysate were analyzed by Western blotting. NET formation was observed by staining extracellular DNA using a cell-impermeable DNA fluorescent dye. **Results:** NET-like structures were observed by fluorescence staining in the ATRA-treated HL-60 cells after *F. nucleatum* stimulation. The expression levels of histone H3 in the culture supernatant and citrullinated histone H3 in the cell lysate were increased after *F. nucleatum* stimulation. **Conclusion:** These results suggest that NET production by neutrophils might act as a protective role against periodontal disease.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-3 健常者の唾液亜鉛イオン濃度と他の唾液マーカーとの関係性について

○秦 史子¹, 葛城 啓彰²

¹日歯大新潟 3年

²日歯大新潟 微生物

【目的】亜鉛欠乏と味覚異常の関係は良く知られているが、唾液中の亜鉛濃度の基準値は良くわかっていない。そこで今回我々は、健常者の唾液中の亜鉛濃度を測定し他の唾液マーカーと比較検討した。【方法】被験者は、18-25歳の健常男子50名、健常女子35名を対象とした。被験者には実験の趣旨を良く説明し、インフォームドコンセントを得て行った。唾液採取は、ホルモン変動の影響の少ない午後3時前後に採取した。ガムテストによる全唾液採取後、その全唾液を検体とし、培養法により総菌数、カンジダ数、酵素測定法によりアミラーゼ活性、白金電極法により酸化還元電位(ORP)を測定した。唾液中亜鉛イオン濃度はメタロアッセイ法(MG Metallogenics)を用いて測定し他の指標との関係性を検索した。【結果】唾液亜鉛イオン濃度は、7.4-354.5 μg/dLの範囲内であり、男女間で有意な差異は認められなかった。唾液亜鉛イオン濃度とカンジダ数との間に有意な相関が認められた(p<0.05)。唾液亜鉛イオン濃度と他の因子との間には、有意な相関関係は認められなかった。【結論】以上の結果から、唾液イオン濃度は口腔内の健康状態を把握する指標の1つになりうる可能性が示唆された。今回、唾液亜鉛イオン濃度には男女差は認められなかったが、今後、日内変動、加齢による影響等を検討するべきだと考える。【利益相反】利益相反状態にはありません。

The Zn²⁺ level in saliva and relationship with other saliva markers of healthy subjects

○Hata F¹, Katsuragi H²

¹Nippon Dent Univ at Niigata

²Dept Microbiol, Nippon Dent Univ at Niigata

Objective: The sense of taste was based on the lack of Zn²⁺, so we tested the Zn²⁺ level in saliva from healthy subjects and compared with other saliva markers. **Method:** We used 85 healthy young volunteers aged 18-25, 50 males, 35 females, and gave them the explanation of the purpose of this research and informed consent. We checked the amount of saliva, amylase activity and Zn²⁺ concentration (Metalloassay LS, MG Metallogenics), bacterial and fungus numbers, oxidation-reduction potential (OPR). This research was supported by the ethical committee of Nippon Dental University school of Life Dentistry at Niigata (ECNG-6). **Results:** Zn²⁺ concentration was ranged 7.4-354.5 μg/dL and there was no significant difference with male and female. There was significant correlation with Zn²⁺ concentration and fungus numbers in saliva (p<0.05). **Conclusion:** These results suggested that Zn²⁺ concentration have a potential as a marker of oral health condition. In this study, we showed that the Zn²⁺ concentration was no significant difference with male and female of health young adults. So we should check about circadian change or influence of aging on the Zn²⁺ concentration in saliva.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-4 唾液腺再生モデルにおけるサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素 PACE4 の発現誘導-Part II-

○嶋谷 達哉^{1,2}, 嶺岸 誠^{1,3}, 赤松 徹也^{1,4}, 姚 陳娟¹, 長谷川敬展¹, 吉村 弘¹

¹徳大 院医歯薬 口腔分子生理

²徳大 歯 4年

³徳大 歯 6年

⁴徳大 院生物資源産業 生体分子機能

【目的】我々はこれまでに、唾液腺再生モデルとして知られる主導管結紮-再開放系において、サチライシン様前駆体蛋白質変換酵素(SPC)である PACE4 が著しく発現誘導されることを報告した。今回、PACE4 の発現レベルと唾液腺の再生・回復の期間・程度との関連性について検討した。

【方法】7週齢雌雄のSDラットを深麻酔下、右側顎下腺主導管を結紮(L)し、左側は非結紮対照(CL)とした。結紮1-9週間後(L1-L9)、および結紮1週間後に再開放し、更に1-8週間後(L1O1-L1O8)に各々顎下腺を摘出して解析した。

【結果・考察】雌雄共に対照群(CL)の変化はなく、結紮群(L1-L9)では顎下腺の萎縮と腺重量の減少が認められたが、♂では結紮期間に応じて減少する傾向にあるのに対し、♀ではL2-L9で差は認められなかった。再開放群(L1O1-L1O8)では腺重量の回復が認められたが、♂ではL1O4以降の回復に差はなく、60%程度の回復に留まった。一方、♀では♂より優位に80%程度まで回復した。Western blot 解析の結果、結紮群での PACE4 発現の誘導を確認したが、再開放群での PACE4 発現レベルは AQP5 発現レベルの回復度に依存し、AQP5 発現が十分回復した場合に PACE4 発現は認められなくなるが、回復が不十分な場合に PACE4 発現は引続き認められた。以上のことから、本唾液腺再生過程において回復期間の延長は唾液腺再生に一定の効果はあるものの、機能的(AQP5 発現レベル)回復が優先され、PACE4 発現レベルと機能回復との関連性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Induction of a subtilisin-like proprotein convertase PACE4 in regeneration model of salivary gland -Part II-

○Shimatani T^{1,2}, Minegishi M^{1,3}, Akamatsu T^{1,4}, Yao C¹, Hasegawa T¹, Yoshimura H¹

¹Dept Mol Oral Physiol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

²4th grade, Fac Dent, Tokushima Univ

³6th grade, Fac Dent, Tokushima Univ

⁴Field Biomol Func & Technol, Tokushima Univ Grad Sch Biosci & Bioind

We previously reported the remarkable induction of a subtilisin-like proprotein convertase, PACE4 in regeneration model of salivary gland by ligation and re-opening of the main excrete duct of submandibular gland. Here, we investigated the correlation between the expression level of PACE4 and the period and degree of salivary gland regeneration.

The atrophy and weight decrease of the ligated glands, but not the contralateral glands (CL), were observed. Although the decrease of gland weight in male rats was gradually observed through the period of ligation (1-9 weeks; L1-L9), that in female rats was almost same level in L2-L9 rats. In the re-opening group (L1O1-L1O8), the recovery of ligated gland weight in male rats did no more than about 60% of CL, even though the regeneration period is long (L1O4-L1O8). It was reached to about 80% of CL in female rats. By Western blotting, the induction of PACE4 expression was observed in the ligated glands, but not in the CL. Its level by re-opening seemed to be inversely dependent on the recovery of AQP5 level, suggesting the correlation of PACE4 level and the functional recovery of salivary gland regeneration.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-5 ムスカリン受容体を介するカルシウム応答に対する局所麻酔薬の抑制作用とその作用機序

○島谷 真梨, 岩田 采奈, 根津 顕弘, 谷村 明彦

北医療大 歯 薬理

【目的】局所麻酔薬は、電位依存性 Na⁺チャネルを抑制することが知られている。我々は、局所麻酔薬やその誘導体である QX314 (QX)が、カルバコール(CCh)による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を抑制することを見出し、そのしくみを解析したので報告する。

【方法】Hanks-HEPES 液に浮遊させた HSY 細胞に fura-2 を取り込ませ、蛍光光度計(Hitatch F2500)を用いて細胞内 Ca²⁺濃度の変化を測定した。

【結果と考察】リドカイン (150 μM:約 0.0035%)は、CCh (50 μM)による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を抑制した。また、プロピトカイン (50 μM), メピバカイン (50 μM), プロカイン (10 μM), および細胞膜を通過しないイオン型局所麻酔薬誘導体である QX (50 μM)でも同様の抑制作用が見られた。この CCh による Ca²⁺応答の抑制におけるリドカイン, プロカイン, QX の EC₅₀は各々 123.9 μM, 20.4 μM, 36.4 μM であった。QX による Ca²⁺応答の抑制は、細胞外 Ca²⁺非存在下でも観察されたことから、QX が細胞内ストアからの Ca²⁺放出を抑制したことが示唆された。一方、QX は SERCA ポンプ阻害剤のタプシガーギンや PLC 活性化剤の m3M3 による Ca²⁺上昇は抑制しなかったことから、Ca²⁺ストアの感受性、ストアにおける Ca²⁺リークや Ca²⁺の取込み、細胞外からの Ca²⁺の流入や排出には影響しないことが示された。これらの結果から、QX による Ca²⁺応答の抑制は、ムスカリン受容体の抑制によるものと考えられた。さらに ATP 刺激による Ca²⁺応答に対する QX の抑制作用は非常に弱かった。これらのことから、QX や局所麻酔薬が、比較的特異的にムスカリン受容体を抑制することが明らかになった。

【結論】局所麻酔薬や QX がムスカリン受容体の抑制によって CCh による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を抑制することが示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Inhibitory effect of local anesthetics on the muscarinic receptor-mediated Ca²⁺ responses in HSY human salivary cell line

○Shimatani M, Iwata A, Nezu A, Tanimura A

Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Local anesthetics are known to inhibit the voltage-dependent sodium channels. The present study reports a novel effect of the local anesthetics on the suppression of carbachol (CCh)-induced Ca²⁺ responses in HSY, human salivary ductal cell line. We also examined the mechanisms for this suppression by monitoring Ca²⁺-dependent change in fluorescence of fura-2 using a spectrofluorometer.

Lidocaine (150 μM = ~0.0035%) suppressed the increase in the intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) with 50 μM CCh. Similar inhibitory effects on the CCh-induced Ca²⁺ responses were observed with propitocaine, mepibacaine, procaine, and QX314 (QX), a cell-impermeable analogue of lidocaine. EC₅₀ values of lidocaine, procaine, and QX on reducing CCh-induced Ca²⁺ responses were 123.9 μM, 20.4 μM, 36.4 μM, respectively. QX also reduced CCh-induced Ca²⁺ responses in the absence of extracellular Ca²⁺, indicating the reduction of Ca²⁺ release from intracellular stores. On the other hand, QX had no effect on [Ca²⁺]_i after the treatment with SERCA inhibitor, thapsigargin nor PLC activator m3M3. Furthermore QX showed a very weak inhibitory effect on ATP-induced Ca²⁺ response. Together with these results, QX and local anesthetics have a relatively specific inhibitory effect on muscarinic receptors.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-6 新規組織透明化技術による歯および歯周組織の立体構造解析

○関 有里, 石田 成美, 谷村 明彦

北医療大 歯 薬理

【目的】組織の光透過性を高める臓器透明化技術は、組織・個体レベルのイメージングの実現に必要な技術である。特に最近、骨を透明化できる新しい透明化試薬が開発され、歯科領域での利用が期待される。本研究では、この新規透明化試薬を用いて、骨を含む様々な組織の立体構造を解析するためのイメージング技術を開発する。

【方法】マウスあるいはラットから摘出した臓器（顎下腺、腎臓、大腿骨、切歯を含む歯槽骨）をパラホルムアルデヒドで固定した。これらのサンプルを蒸留水中に一晩、透明化液 A に 1 日浸漬後、透明化液 B で室温保存した。これらのサンプルを透明化液 B で 3 日以上保存し、共焦点レーザー顕微鏡（Nikon C1）および多光子レーザー顕微鏡（Carl Zeiss Radianc2100MP）を使って立体構造を観察した。

【結果】透明化処理した組織は、透明度の高いやや白色（顎下腺と大腿骨）あるいは茶褐色（腎臓）の組織として観察された。GFP マウス組織の共焦点レーザー顕微鏡観察では、強い蛍光が認められた腎臓糸球体が表面から 200 μm の深部まで観察できた。また大腿骨では表面から約 20 μm までの深度で骨細胞の微細なネットワーク構造が観察された。現在、蛍光染色と透明化技術によって歯槽骨や歯などの硬組織の透明化観察を試みている。

【考察】新規透明化試薬によって、ホルマリン固定した未脱灰の大腿骨中の骨細胞のネットワークを明瞭に観察することができた。また、従来法と比較して簡便で、組織の膨潤が起らないことから、軟組織の立体構造解析にも利用できる事が示された。今後、歯の透明化が可能になれば、歯科での有用性がさらに高まると期待される。

【結論】骨を含む組織のホルマリン固定サンプルを透明化し、共焦点レーザー顕微鏡観察によって立体構造を解析する方法を開発した。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Visualization of the three-dimensional structures of teeth and periodontal tissues with new tissue clearing technology

○Seki Y, Ishida N, Tanimura A

Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Tissue clearing technique is useful for examining the three-dimensional (3D) structures of tissues and a whole animal. Recently, a new reagent capable of transparent bone has been developed. We used this reagent to develop methods for analyzing the 3D structures of various tissues. In this study, several tissues such as the submandibular glands, kidneys, femur, and teeth from mice and rats were fixed with paraformaldehyde, and treated with the clearing solutions. 3D structures of cleared samples were observed using the confocal laser microscopy and multi-photon laser microscopy.

The macroscopical appearance of cleared samples (bone and soft tissues) were highly transparent with white or brown color. In the confocal laser microscopy of GFP mice kidney, glomeruli showed strong fluorescence, and were observed in the Depth of 200 μm . We could also observe fine network structure of osteocytes at a Depth of 20 μm in the femur. This new tissue clearing reagent allowed us to observe a fine network structures of osteocytes in a non-decalcified femur. In addition, this clearing method did not cause the swelling of soft tissues. We are trying to develop a method for clearing the teeth to enhance the usefulness in the dental field.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-7 II型糖尿病モデル SDT fatty ラットにおける下顎骨歯周組織の組織化学的検索

○吉田 泰士¹, 本郷 裕美², 坪井香奈子², 長谷川智香², 網塚 憲生²

¹北大 歯 3年

²北大 院歯 硬組織発生

【緒言】我々は、糖尿病による歯周組織の異常を組織化学的に解明するため、従来の糖尿病モデルよりも重篤なII型糖尿病を発症するSDT (Spontaneously Diabetic Torii) fatty ラットを用いて、下顎骨臼歯部の歯周組織を組織化学的に検索した。【材料と方法】42週齢SDT fatty ラット、および、同系列のSD ラット (42週齢:コントロール群) を4% PFAにて灌流固定し、下顎骨を摘出後、同固定液に24時間浸漬した。その後、通法に従い、パラフィン包埋後に下顎骨の矢状断切片を作製し組織化学的検索を行なった。【結果と考察】H-E染色を観察すると、コントロール群に比べて、SDT fatty ラット下顎骨の歯槽骨、特に根間中隔は、その高さが著しく低下していた。TRAP染色にて破骨細胞を検索すると、骨吸収を受けたと思われる鋸歯状の歯槽骨表面に、多数のTRAP陽性破骨細胞を認めた。ALP免疫組織化学を行うと、同部位において多数のALP陽性骨芽細胞が観察された。よって、SDT fatty ラットの歯槽骨は著しい骨吸収を受けたが、骨芽細胞の活性は維持されていると推察された。一方、歯髓組織は壊死しており、髓腔内部にヘマトキシリン濃染の細菌塊を認めた。さらに細菌塊はセメント質まで侵入しており、多数の空のセメント小腔が観察された。上皮組織は、厚い線維性組織を伴いながら、根尖部に至るまで下降・侵入していた。このように、SDT fatty ラットは、歯周組織における細菌感染が歯周組織深部に及ぶ一方、上皮組織と線維性組織の増生を示した。以上より、SDT fatty ラットは高度な細菌感染と著しい歯槽骨の吸収を示す糖尿病性歯周病を発症することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Histochemical examination on mandibular periodontal tissues of obese type II diabetic SDT fatty rats

○Yoshida T¹, Hongo H², Tsuboi K², Hasegawa T², Amizuka N²

¹Hokkaido Univ Sch Dent Med

²Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Introduction: In order to provide a clue for understanding histopathological aspects of periodontal tissues induced by Diabetes mellitus (DM), we have histochemically examined the periodontal tissues of mandibles of obese type II diabetic SDT fatty rats. **Materials and Methods:** Forty two-weeks old male SDT-fa/fa (fatty) rats and age-matched Sprague-Dawley (SD) rats were fixed with 4% PFA, and their mandibles were extracted and embedded into paraffin for histochemical examination for H-E, TRAP, ALP staining. **Results and Discussion:** H-E staining of SDT mandibles demonstrated that, unlike SD rats, SDT alveolar bone, especially the interradicular septum, was markedly-reduced in height. Many TRAPase-reactive osteoclasts and ALPase-positive osteoblasts were localized on the scalloped-shaped surfaces of the SDT alveolar bone. In SDT rats, the dental pulp was shown to be necrotic including many bacterial masses inside. In addition, bacterial masses were observed in cementum which possessed many empty lacunae without cementocytes. Gingival epithelium accompanying thick fibrous tissues have invaded in the deeper portion of the periodontal tissue, such as to the Dept h of the apical region of the tooth roots. Summarizing, SDT fatty rats appear to develop the DM-induced periodontitis with aggressive bacterial infection, acute epithelial invasion and alveolar bone resorption.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-8 ブタ幼若エナメル質中のアメロゲニン・TGF- β 複合体と TGF- β 受容体との結合能について

○野田 千尋¹, 藤浪さをり¹, 山本 竜司², 小林 冴子³, 大井田新一郎², 山越 康雄²

¹鶴大 歯 4年

²鶴大 歯 分子生化

³鶴大 歯 小児歯

トランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- β) は細胞膜上の 2 型 TGF- β 受容体 (TGFBR2) に結合した後, 1 型 TGF- β 受容体 (TGFBR1) と結合することで, 下流の Smad ファミリーにシグナルが伝達していく. ブタ幼若エナメル質中にはアメロゲニンと結合した TGF- β 1 (Amel-TGF β 1) が存在するが, 上記受容体との結合能に関しては不明である. 【目的】我々はブタエナメル器中の TGF- β 受容体と Amel-TGF β 1 との結合能を *in vitro* 実験で調べることを目的とした. 【方法】生後約 5 ヶ月のブタ永久切歯の基質形成期に相当するエナメル器より膜タンパク質画分 (EOE-Mem) を抽出し, TGFBR1 に対する蛍光ペプチドを基質としてリン酸化酵素アッセイを時間分解蛍光-蛍光共鳴エネルギー転移法 (TR-FRET) にて行い, ATP 濃度の最適化, リコンビナント TGF- β 1 (rhTGF- β 1) 添加による反応の促進, SB431542 を用いた阻害実験について検討した. さらに同齢のブタ永久大白歯の幼若エナメル質から Amel-TGF β 1 を分離精製して TGF- β 受容体との結合能を TR-FRET にて調べた. 【結果】EOE-Mem を用いた TR-FRET アッセイでは ATP 濃度, rhTGF- β 1 の存在の有無に依存した蛍光強度が得られた. このリン酸化反応は TGFBR1 の阻害剤である SB431542 の存在下で抑制された. さらにブタ幼若エナメル質から精製した Amel-TGF β 1 と EOE-Mem を用いた TR-FRET 実験においてもリン酸化反応の促進が認められた. 【考察】TR-FRET 実験の結果より EOE-Mem には TGFBR1 および TGFBR2 が含まれていることが示唆され, 幼若エナメル質中の Amel-TGF β 1 複合体が両受容体と結合することでシグナル伝達が進行することが考えられた.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Binding ability of TGF- β receptors and amelogenin-TGF- β complex in porcine immature enamel

○Noda C¹, Fujinami S¹, Yamamoto R², Kobayashi S³, Oida S², Yamakoshi Y²

¹4th grade, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Biochem Mo Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med

The signaling of transforming growth factor beta (TGF- β) occurs by binding to two TGF- β receptors in the order of type 2 (TGFBR2), type 1 (TGFBR1). Our **objective:** is to investigate the *in vitro* binding ability of TGF- β receptors and amelogenin-TGF- β 1 complex. **Methods:** The secretory-stage of enamel organ epithelium was prepared from the developing incisor of 5-months-old pig and the membrane-associated proteins containing TGF- β receptors (EOE-Mem) were extracted. The amelogenin-TGF- β 1 complex was also purified from the immature enamel of the developing molar of 5-months-old pig. The fluorescence peptide for TGFBR1 as the substrate was incubated in EOE-Mem solution with or without the recombinant TGF- β 1 (rhTGF- β 1) or amelogenin-TGF- β 1 complex. Three kinase assays for TGFBR1; (1) ATP titration, (2) enzyme time course and (3) enzyme inhibition with SB431542 were carried out with the method of time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET). **Results:** The addition of rhTGF- β 1 and amelogenin-TGF- β 1 complex enhanced the FRET signal depending on ATP concentration, while the addition of SB431542 inhibited the enzyme reaction. **Discussion:** These results suggest that both TGFBR1 and TGFBR2 are presence in EOE-Mem. The binding of TGF- β receptors and amelogenin-TGF- β 1 complex progresses the TGF- β signaling in porcine immature enamel.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-9 マウスの歯胚における *Hey1* および *Hey2* 遺伝子発現の定量的解析

○木部 琴乃¹, 中富 満城², 片岡 真司², 豊野 孝², 瀬田 祐司²

¹九歯大 5年

²九歯大 解剖

【目的】 将来的な歯の再生の実現の為に正常な歯の発生過程における遺伝子機能の正確な理解が不可欠である。本研究で着目する Hairy 関連転写因子ファミリーの *Hey1* および *Hey2* 遺伝子は四肢、心臓、血管等の形成に関与することが知られているが、歯胚発生における機能は未解明である。我々はこれまでに、歯胚発生における両遺伝子の組織学的発現パターンを解析してきた。本研究では、さらに発現量の時期特異的な変化についての定量的解析を試みた。

【方法】 野生型マウスの胎齢 17 日 (以下 E17) および生後 3 日 (以下 P3) の個体より下顎第一臼歯の歯胚を摘出し、total RNA を抽出した (N=3)。対照群として E17 の舌尖部を用いた。通法に従い cDNA を合成後、*Hey1*, *Hey2*, *GAPDH* のプライマーを用いてリアルタイム PCR 法にて解析を行った。

【結果】 定量的解析において *Hey1* の発現量は E17 より P3 の方が有意に高く、*Hey2* の発現量は P3 より E17 の方が有意に高かった。また *Hey1*, *Hey2* 共に舌尖部における発現量は歯胚と比較して有意に低かった。これまでの組織学的解析より *Hey1* の発現は胎生後期に内エナメル上皮と象牙芽細胞下層の一部にのみ見られ、生後には歯髓全体に拡大し、一方 *Hey2* は胎生期に内エナメル上皮に強く発現し生後には発現が急激に低下することが分かっている。

【考察】 定量的解析結果は組織学的発現パターンと概ね一致し、*Hey1* と *Hey2* が歯胚の発達段階に応じて異なる機能を果たしている可能性が示唆された。血管が豊富に存在する舌尖部と比較して歯胚で著しく高い発現量を示した事から、両遺伝子はこれまでに知られている全身の血管構築への関与に加えてエナメル芽細胞分化等の歯胚発生特異的な機能を有している可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Quantitative analysis of *Hey1* and *Hey2* gene expression during mouse tooth development

○Kibe K¹, Nakatomi M², Kataoka S², Toyono T², Seta Y²

¹5th grade, Kyushu Dent Univ

²Div Anat, Kyushu Dent Univ

It is important to elucidate the entire mechanism of normal tooth development to realize tooth regeneration in the future. *Hey1* and *Hey2* genes, which encode Hairy-related transcription factors, are known to be involved in heart and limb development. However their roles in tooth formation have not been reported so far. In addition to our previous research on their detailed spatiotemporal mRNA expression patterns, this study aimed to analyze their stage-dependent gene expression level quantitatively during odontogenesis. Total RNA was extracted from lower first molars of embryonic day 17 (E17) embryos and postnatal day 3 (P3) newborns of mice. Total RNA derived from the tip of the tongue was used as control. Quantitative analysis was carried out by real-time PCR using primers for *Hey1*, *Hey2* and *GAPDH*. *Hey1* expression at P3 was significantly higher than E17 whereas *Hey2* expression at E17 was significantly higher than P3. The expression level of both genes was significantly lower in the tongue than in the tooth germ. The results of quantitative analyses were almost accorded with the histological expression patterns. Our data suggest that *Hey1* and *Hey2* may play different roles in a stage-dependent manner during tooth development.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-10 *c-fos* 遺伝子欠損マウスの骨細胞における微細構造学的検索

○阿部 未来¹, 長谷川智香², 山本知真也², 土屋恵李佳², 宇田川信之³, 網塚 憲生²

¹北大 歯

²北大 院歯 硬組織発生

³松歯大 口腔生化

【目的】 *c-fos* 遺伝子欠損 (*c-fos*^{-/-}) マウスは破骨細胞を欠損するため、骨基質は骨改造を受けず、一度、骨基質に包埋された骨細胞は、長期間、その状態を維持することになる。我々は、骨改造を受けない状態の骨細胞の微細形態・機能を明らかにする目的で、*c-fos*^{-/-}マウスの大腿骨・脛骨を組織化学的に解析した。

【材料と方法】 生後8週齢の野生型マウスと *c-fos*^{-/-}マウスをアルデヒド固定し、大腿骨・脛骨をパラフィンまたはエポキシ樹脂に包埋した。その後、免疫組織化学 (E11, FGF23, sclerostin, type X collagen), 鍍銀染色, ならびに、透過型電子顕微鏡による解析を行った。

【結果と考察】 野生型マウスの骨幹端骨梁において、一部の骨芽細胞と骨基質表層に局在する骨細胞が E11 (骨細胞の分化初期マーカー) 陽性反応を示した。骨梁の骨細胞はやや不規則な骨細管系を有し、皮質骨の骨細胞と比べると、FGF23/sclerostin 弱陽性反応を示した。一方、*c-fos*^{-/-}マウスの骨梁内部の骨細胞はごく短い細胞突起しか伸ばしておらず、骨梁内部に存在する軟骨基質によって、骨細管同士の連結が遮断されていた。これらの骨細胞は著しく減弱した FGF23/sclerostin 陽性反応しか示さなかった。興味深いことに、大腿骨の骨幹端中央部に島状に取り残された type X collagen 陽性軟骨基質に内在する肥大化軟骨細胞は、E11 および sclerostin 陽性反応を有する傾向が認められた。以上、*c-fos*^{-/-}マウスでは、骨細胞が本来の細胞機能を十分に果たせない可能性、一方で、肥大化軟骨細胞が骨細胞の機能を、一部、獲得する可能性が推測された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Ultrastructural assessment on osteocytes in *c-fos* deficient mice

○Abe M¹, Hasegawa T², Yamamoto T², Tsuchiya E², Udagawa N³, Amizuka N²

¹Sch Dent Med, Hokkaido Univ, Sapporo, Japan

²Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

³Dept Oral Biochem, Matsumoto Dent Univ

Objective: In *c-fos*^{-/-} mice, once-embedded osteocytes are present in situ for a long time, due to a lack of bone remodeling. We have examined *c-fos*^{-/-} femora and tibiae for understanding morphological features and function of *c-fos*^{-/-} osteocytes.

Materials and Methods: Eight-weeks old *c-fos*^{-/-} mice and their wild-type littermates were fixed with an aldehyde solution and embedded in paraffin and epoxy resin for examining histochemistry of E11 (a young osteocyte maker), FGF23, sclerostin and type X collagen, as well as TEM observation.

Results and Discussion: In wild-type femoral metaphyses, E11-immunoreactivity was observed in some osteoblasts and osteocytes in the superficial layer of the bone matrix, the latter of which revealed an irregular distribution of their canaliculi showing less intense FGF23-, and sclerostin-immunopositivity. In contrast, osteocytes in *c-fos*^{-/-} femoral trabeculae extended short cytoplasmic processes, which were disconnected due to the inner cartilage cores. Unlike wild-type counterparts, *c-fos*^{-/-} osteocytes showed little expression of FGF23-, and sclerostin. Interestingly, several hypertrophic chondrocytes encompassed by type X collagen-reactive cartilage remnants in the metaphyses tended to show FGF23- and sclerostin-immunoreactivity. Thus, it is likely that the biological function of *c-fos*^{-/-} osteocytes would be lessened, but instead, *c-fos*^{-/-} hypertrophic chondrocytes might obtain some characteristics of osteocytes.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-11 マウスの“社会的”時差ボケ

○中西祐一郎^{1,2}, 草野慎之介^{1,2}, 高須 奈々^{2,3}, 中村 渉²

¹阪大 歯

²阪大 院歯 口腔時間生物

³日本学術振興会 (RPD)

近年、一般社会において生活を営む上で、社会的時刻と体内時計に依存した生物学的時刻との間に乖離が生じた、いわゆる「社会的時差ボケ」の健康リスクが提言されている。本研究では、「社会的時差ボケ」の成因機序として“週末の夜更し・朝寝坊”に着目し、平日と週末のスケジュール変移に伴って生じる光環境シフトをシミュレートしてマウス輪回し行動リズムを測定した。マウスを12時間毎に点灯(8:00)/消灯(20:00)する24時間周期の明暗環境条件下で飼育し輪回し行動を記録すると、毎日消灯時刻後数分以内に輪回しを開始する正確な日内行動リズムを示す。その後、5日間(平日)を8:00/20:00の明暗サイクルに設定し、2日間(週末)を11:00/23:00の明暗サイクルにシフトさせる“週間”サイクル条件に移行した。明暗サイクル3時間シフトから通常明暗サイクルに復帰させた翌日、マウスは消灯2.7時間後に輪回しを開始した。消灯時間を社会的起床時刻、実際のマウス輪回し開始を生物学的起床時刻とすると、両起床時刻に乖離が生じたことになる。輪回し行動の開始は消灯時刻を20時に戻した3~4日後に再び消灯時刻と一致した。行動開始時刻の遅れは、7日間に1サイクルの明暗環境3時間後退シフトによっても生じた。さらに消灯時刻の3時間後退で生じる一方、点灯時刻の遅れでは生じなかった。以上の結果により、本来消灯すべき時刻に光に曝露されたことにより、翌日の活動開始タイミングの後退を引き起こすことがわかった。週末の「夜更かし(夜間の光曝露)」によって、翌月曜日に生じる「起きたい時刻(社会的起床時刻)」と「身体が起きる時刻(生物学的起床時刻)」との乖離は容易に解消されず、その影響は週全日に及ぶことが明らかになった。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

“Social” jet lag in mice

○Nakanishi Y^{1,2}, Kusano S^{1,2}, Takasu N^{2,3}, Nakamura W²

¹Dept Dent, Osaka Univ

²Lab Oral Chronobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

³JSPS (RPD)

Recently, the number of people showing social jet lag (the mismatch between our body's internal clock and our daily schedules) and the serious health consequences is increasing. In the present study, we investigated the impact of a light-dark cycle that simulated weekly social jet lag. When mice are maintained under 12-h light/ 12-h dark cycles (lights on at 08:00), they show the extremely precise circadian wheel-running behavior that began within a few minutes after light-off every day. These mice were then exposed to light from 8 A.M. to 8 P.M. for 5 days (weekdays), which was followed by a shift in the exposure to light from 11 A.M. to 11 P.M. for 2 days (the weekend). Immediately after recovering from the 3-h time difference to which they were exposed to for 2 days, the mice ran on wheels beginning at 2.7 h after the light-off. Although their circadian rhythm starting time became closer to the light-off every day, it required 4 cycles for complete recovery. Thus, it was demonstrated that a 3-h “Social” jet lag once a week affected the entire week.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-12 視交叉上核の概日リズム位相後退が引き起こす“社会的”時差ボケ

○草野慎之介^{1,2}, 中西祐一郎^{1,2}, 高須 奈々^{2,3}, 中村 渉²

¹阪大 歯

²阪大 院歯 口腔時間生物

³日本学術振興会 (RPD)

「ブルーマンデー」は我々大学生にとっても深刻な問題であり、社会的不適応の一因となり得る。生理機能や行動の概日リズムを制御する体内時計中枢は、視床下部・視交叉上核に存在する。視交叉上核は自律的に約 24 時間（概日）のリズムを刻み、環境光の変化を入力することで、概日リズムを 24 時間周期に調整している。本研究では、「ブルーマンデー」の成因・機序を解明するため、光環境を操作し“社会的時差ボケ”モデルマウスを作製した。12 時間毎に点灯/消灯する 24 時間周期の明暗環境条件下でマウス輪回し行動を記録すると、毎日消灯時刻に輪回しを開始する正確な日内行動リズムを示す。その後、5 日間を 8 時/20 時の明暗サイクルに設定し、2 日間を 11 時/23 時の明暗サイクルにシフトさせる“週間”サイクル条件に移行した。同条件下での視交叉上核リズム出力動態を明らかにするため視交叉上核にワイヤー電極を挿入し、自由行動下における神経活動記録を行った。視交叉上核の神経活動は明期に高発火頻度/暗期に低発火頻度を示す明瞭な日内リズムを示した。定常の昼：高/夜：低の神経活動は、消灯時刻の 3 時間遅延時に高発火頻度を維持し、リズム位相の後退を示した。輪回し行動の開始は消灯時刻を 20 時に戻した 3~4 日後に再び消灯時刻と一致し、行動リズムの動態と視交叉上核リズムは一致していた。また、明期の 3 時間延長と、暗期の延長とを比較すると、明期の延長は視交叉上核リズムの位相後退を引き起こすのに対して、暗期の延長は位相変位を示さなかった。以上より、本実験でシミュレートした週間明暗環境シフトサイクルでは、暗期前半に光曝露されることにより容易に視交叉上核リズム位相の後退が生じ、光環境サイクルの前方シフトに再同調するまでには数サイクルの移行期間が必要となることから、慢性的に“社会的”時差ボケ状態が成立することが明らかになった。**【利益相反】** 利益相反状態にはありません。

Early night exposure to lights causes “social” jet-lag

○Kusano S^{1,2}, Nakanishi Y^{1,2}, Takasu N^{2,3}, Nakamura W²

¹Dept Dent, Osaka Univ

²Lab Oral Chronobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

³JSPS (RPD)

Blue Monday is a common issue especially for us, undergraduate student. In mammals, the principal circadian pacemaker driving daily physiology and behavioral rhythms is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the anterior hypothalamus. The neural output of SCN is essential for the circadian regulation of behavioral activity. However, the neural regulations by which the SCN exert control over circadian rhythms including such blue Monday are not well understood. We have examined the neural output of the central clock by means of multiunit neural activity (MUA) in freely moving mice under environmental “social jet-lag” conditions. We implanted single bipolar electrodes into the SCN to monitor the long-term MUA. MUA, recorded in the SCN, displayed clear daily rhythms when animals were exposed to LD cycles. Mice entrained to a 12 hr L:12 hr D (LD) cycle initiated daily locomotor activity at lights off. After 3h delays in the light schedule, SCN rhythms shifted, immediately. Then returning to original phase in LD cycle, the MUA rhythm began to re-entrain, although a complete readjustment took several cycles. These results suggest that the property of “fast delay and slow advance” is a cause of blue Monday.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

PS-13 無血清培地にて培養したヒト歯髄細胞の特性の解析

○加藤 美咲¹, 大谷 憲司², 濱村 和紀³, 本田 雅規¹

¹愛院大 歯 口腔解剖

²株式会社再生医療推進機構

³愛院大 歯 薬理

間葉系幹細胞による細胞治療の臨床応用への期待が高まる中で、歯髄幹細胞は、その細胞源として注目されている。細胞治療には、ある程度の細胞数が必要であり、現在、その細胞培養には牛胎児血清が多用されている。近年、各社から間葉系幹細胞に適した無血清培地が開発されている。そこで、本研究では無血清（他種動物成分不含）培養液 PRIME-XV XSFM（XSFM）と FBS 含有培養液にてヒト歯髄細胞の増殖能、コロニー形成能、遺伝子発現パターンおよび分化能について比較したので報告する。ヒト歯髄細胞は再生医療推進機構より供与された。XSFM 培地を用いた細胞培養にはフィブロネクチンコートした培養皿とトリプシンを用いた継代操作を行い、3~5 継代した細胞を本実験に使用した。初めに DMSO 不含と従来汎用されている DMSO 含有凍結保存液を用いて解凍後に回収した細胞数と生存率および細胞の増殖率を比較した。細胞の増殖試験では 6well プレートに細胞を播種後、24 時間ごとに細胞数を計測した。コロニー形成試験では 400 細胞/100 mm 培養皿に播種後 14 日後の 50 細胞以上のコロニーを計数した。次に、PrimerArray ES 細胞を用いた遺伝子発現解析と骨芽細胞と脂肪細胞への分化誘導実験を行った。XSFM 培地を用いてもヒト歯髄細胞は血清含有培地と同様に増殖し、コロニー形成能および分化能を示した。試薬間における解凍後の回収細胞数と増殖率および遺伝子発現解析の一部に異なる結果が観察されたが、ほぼ類似した傾向が観察された。以上の結果から、ヒト歯髄細胞において XSFM 無血清培地は従来用いられてきた牛胎児血清含有培地と類似した効果が得られることが分かった。牛胎児血清は個体差による成分が細胞増殖能等に影響するので、無血清培地にて、その問題は解決できることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にあります。

Effect of serum-free/xeno free media on human dental pulp cellsA

○Kato M¹, Otani K², Hamamura K³, Honda M¹

¹Div Oral Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

²Adv Center for Tissue Engineering Ltd

³Div Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Generally, mesenchymal stem cells (MSCs) are expanded as an adherent monolayer in a medium supplemented with fetal bovine serum. However, the use of animal serum in cell culture is associated with several disadvantages. Therefore, stem cell therapy utilizing human dental pulp cells (hDPCs) has emerged as an alternative approach in various pathologic conditions. Recent efforts have focused on the development of animal serum-free and xeno-free culture media (SFM/XF). The objective of this study was to investigate the effects of PRIME-XVR MSC Expansion XSFM (XSFM) on hDPC behavior *in vitro* compared to standard culture conditions (FBS-media). We initially examined the growth and survival potential of hDPCs after freezing and re-thawing. Next, we examined the cells proliferation, colony-forming unit fibroblast (CFU-F), and osteogenic and adipogenic differentiation capacity. Finally, we analyzed the gene expression pattern by using a human primer set [PrimerArray Embryonic Stem Cells]. We found that SFM/XF did not alter hDPC proliferation or CFU-F *in vitro*. HDPCs cultured in SFM/XF displayed alterations in gene expression patterns. Our study suggests that while the use of SFM/XF is available for hDPC expansion, the use of SFM/XF needs detailed investigation prior to clinical implementation.

Conflict of Interest: The authors have competing interests with this presentation.

P2-1 下顎舌側領域における顎舌骨筋および静脈分布の関係

○崎山 浩司, 坂東 康彦, 小峰 雄介, 三宅 言輝, 平良芙蓉子, 坂下 英,
天野 修

明海大 歯 解剖

【目的】これまでインプラント埋入手術において、下顎骨の穿孔による血管損傷などのトラブルが報告されている。特に、前歯部の血管分布については動脈だけでなく静脈もまた、インプラント手術や歯周外科手術など粘膜を剥離する際に注意が必要な構造物であるが、これまで詳細な報告はなされていない。そこで今回、下顎前歯部舌側領域の静脈分布状態を局所解剖学的に明らかにする目的で、顎舌骨筋の付着状態と舌下静脈およびオトガイ下静脈の走行との関係について検索を行った。【方法】明海大学歯学部解剖学分野所蔵の10%ホルマリン固定された解剖実習用屍体の頭頸部を研究対象とした。舌下静脈については、口腔底の粘膜を切開後、舌下腺を剥離し舌下静脈を観察した。オトガイ下静脈については、広顎筋を切除後、顎下腺、顎二腹筋を剥離し下顎骨下縁を観察可能な状態にした。その後、口腔底における両者の走行と顎舌骨筋の付着状態について肉眼解剖学的観察を行った。【結果&考察】顎舌骨筋は、下顎骨大白歯部後部から犬歯部付近までは顎舌骨筋線より起始しているが、さらに連続性が途切れ、少し低い位置から再び起始する例が認められた。その場合、間隙を通過してオトガイ下静脈へ開口する静脈が観察された。それに対し舌下静脈は下顎骨舌側には走行していなかった。これらのことから、下顎前歯部舌側領域において注意すべき静脈は、オトガイ下静脈の分枝であることがわかった。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Relationship between the mylohyoid and the vein distribution in the antero-lingual region of the mandible

○Sakiyama K, Bando Y, Komine Y, Miyake G, Taira F, Sakashita H, Amano O

Div Anat, Meikai Univ Sch Dent

It is necessary to know the distribution of not only arteries but also veins at the antero-lingual region of the mandible for dental implant and periodontal surgery. Therefore, we aimed to reveal the vein distribution in the oral floor along the medial aspect of the mandible. The materials used in this study were 5 cadavers provided for anatomical dissection to the Division of Anatomy, Meikai University School of Dentistry. We have observed the spacial relationship between the submental vein and the mylohyoid in the oral floor. As a result, we found few cases that an attachment of the mylohyoid along the mylohyoid line was interrupted, and that a branch of the submental vein passed through the gap of the mylohyoid. In conclusion, dental implant and periodontal surgeons have to pay attention to the small branch of the submental vein.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-2 聴覚器官サイズが咬筋内部構造に与える影響～砂漠生齧歯類を用いた検討～

○佐藤 和彦, 矢野 航, 渡邊 竜太, 江尻 貞一

朝日大 歯 口腔解剖

砂漠生齧歯類は、遮蔽物の少ない環境でいち早く外敵を発見するための適応として中耳が肥大するという共通の特徴を持つ。齧歯類における中耳の大型化は隣接する頬骨弓の後端を前方に押しやることから、咬筋の起始領域や走行にも影響を及ぼすものと考えられる。そこで本研究では、2種の砂漠生齧歯類・ミュビトビネズミとメリアムカンガルーネズミの咬筋について肉眼解剖学的観察をおこない、非砂漠生のクマネズミのものと比較した。なお、咬筋内部に存在する腱膜の名称については、Sato and Iwaku (2008)に従った。砂漠生齧歯類2種とクマネズミとの顕著な違いは、起始腱膜の1つである内側頬骨弓腱膜の形状、およびこの腱膜から起始する筋束の走行に認められた。ミュビトビネズミおよびメリアムカンガルーネズミの内側頬骨弓腱膜は後腹側方向に伸びる紐型の形状を呈しており、放射状に広がる筋線維の付着が見られた。一方、クマネズミにおけるこの腱膜は頬骨弓に沿って前後に伸び、互いに平行に走行する筋線維の起始部となっていた。砂漠生齧歯類の内側頬骨弓腱膜は、中耳の肥大化と頬骨弓の短縮に伴う咬筋起始部の面積減少を補うために後腹側方向へ伸長したものと考えられる。また、下顎角突起に付着する後下顎腱膜は、砂漠生齧歯類2種では内外側方向、クマネズミでは前後方向に広がっていた。この相違は、砂漠生齧歯類の中耳が肥大化することによって、下顎角突起が外側方向へ押しやられたことに関係するものと考えられる。小型哺乳類に見られる聴覚器官の適応は、咀嚼筋形態の変化を生み出す場合があり、摂食機能に及ぼす影響についても今後解析をおこなう必要がある。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Influence of hearing organ size on masseter architecture ~A case study in two desert rodents~

○Sato K, Yano W, Watanabe R, Ejiri S

Dept Oral Anat, Asahi Univ Sch Dent

In desert rodent, enlargement of the middle ear is recognized as an adaptation for predator avoidance. This characteristic may modify the architecture and direction of the masseter muscle, posterior part of which is located close to the middle ear. In the present study the architecture of the masseter was observed in two desert rodents, Egyptian jerboas and Merriam kangaroo rats. Then, the anatomical findings were compared with those of a non-desert species, black rats. The nomenclature of aponeuroses is in accordance with Sato and Iwaku (2008). Remarkable differences between two desert species and black rats were recognized in shape of the medial zygomatic aponeurosis (MZAP) and the direction of corresponding fibers. In Egyptian jerboas and Merriam kangaroo rats the strap-like MZAP posteroventrally extended and the fibers pinnately ran from this aponeurosis. In black rats, however, the MZAP is anteroposteriorly long and fibers from this aponeurosis run in parallel with each other. The posteroventral extension of MZAP in desert rodents is considered to compensate for decrease of the masseter origin due to enlarged middle ear. Since the adaptation of hearing organ in small mammals sometimes modifies the architecture of masticatory muscles, influence on feeding function should be analyzed in further study.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-3 マウス胎生期と出生直後の咀嚼筋発育における Tenomodulin の発現について

○佐藤 巖, 三輪 容子, 我妻 由梨, 春原 正隆

日歯大 生命歯 解剖 1

【目的】 Tenomodulin (TeM) は、腱形成時に発現する腱マーカーであり、システインリッチ C 末端ドメインを有している。咀嚼機能を獲得する際の筋分化では TeM は抗血管新生作用があることも知られている。しかし咀嚼筋の形成に関する報告は少ない。【方法と材料】我々の先行研究では胎生 12.5 (E12.5) から生後 5 日 (P5) までのマウス咬筋 (MM) を用いて TeM の mRNA を RT-PCR 等で分析し、血管新生マーカー (CD31 および血管内皮増殖因子 (VEGF)) の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにて検出した。今回、同様の方法で咀嚼筋を含む顎顔面領域の筋の形成過程の TeM の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションレベルで調べた。【結果と結論】腱形成時期に対応して TeM が発現することがわかった。逆に、CD31 および VEGF mRNA のレベルは、出生後に減少し、局在性は低下した。このように MM の表面と深部間の中間層を中心にして各筋の層状腱構造の形成過程において TeM と血管マーカーの発現が変化することが示された。このために TeM は表面と層状腱構造への血管侵入阻害作用への可能性が示され、層状腱構造の形成が筋束の構成要素に関連することが考察される。このため、今後はタンパクレベルでの検討を加え、筋再生時の働きについても検討する予定である。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Expression of Tenomodulin at embryonic and early postnatal mouse masticatory muscle

○Sato I, Miwa Y, Azuma Y, Sunohara M

Dept Anat, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Purpose: Tenomodulin (TeM) is a marker tendons and has an anti-angiogenic cysteine-rich C-terminal domain. TeM is also known as anti-vascularogenesis marker in muscle differentiation during acquirement of mastication. However TeM expression is unknown in development of the masticatory muscle. **Materials & Methods:** Therefore, we analyzed mRNA of TeM and angiogenesis markers (CD31 and vascular endothelial growth factor (VEGF)) and performed *in situ* hybridization for the TeM mRNA in mouse masticatory muscle from on embryonic day 12.5 (E12.5) to postnatal day 5 (P5). **Results & Conclusion:** The level of TeM mRNA in the MM increased from E12.5 to E17.5 and decreased after birth. In contrast, the levels of CD31 and VEGF mRNAs were almost constant from E12.5 to E18.5 and then low from birth onward. This specific events were found in same tendon of head muscles. Therefore, the development of the laminar tendon structure in the MM and other masticatory muscles first occurs during the process of tendon formation at embryonic stages. For this reason, in the future in addition to consideration at the protein level, it is expected to also consider function at the time of muscle regeneration.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-4 胎児期のエタノール曝露は大脳皮質のミクログリアの活性異常に因る形態異常と行動異常を誘発する

○駒田 致和¹, 長尾 哲二², 池田やよい¹

¹愛院大 歯 解剖

²近大 理工 生命科学

胎児期あるいは新生児期にアルコールに曝露すると、特徴的な頭部顔面の形成異常や、発達・学習障害、行動異常などを示す胎児アルコール症候群を発症することが知られている。アルコールは妊娠・授乳中にも摂取しやすく、また他の催奇形物質と異なり毒性の閾値が明確でないこと、個人差が大きいことなどから、その危険性や発症機序を明らかにすることは急務であるが、特に発達・学習障害や行動異常の原因については不明な点が多い。そこで本研究課題では、エタノール曝露モデルマウスとして、妊娠6日から18日(12:00と18:00の2回投与、投与前2時間は絶食)まで25%(w/v)のエタノール0.5, 1, 2 g/kg体重をICRマウスに強制経口投与し、その胎児・新生児を用いて形態学・行動学的解析を行った。前年度の日本毒性学会総会において、胎児期および新生児期の組織構築と成熟期の行動異常については報告した。本年度はさらに、胎児期のエタノール曝露は脳内に炎症を引き起こし、それが一因となりミクログリアに影響を及ぼしていることに着目した。本モデルマウスにおいては、胎児期、新生児期においてミクログリアの異常な増加や活性化が見られた。細胞傷害型であるM1型は増加し、細胞保護型であるM2型は減少していることから、ミクログリアの分化にも影響が及ぼされていることが示唆された。また、ミクログリアの活性を制御するサイトカイン、栄養因子、細胞外シグナルにも影響が確認された。これらのことから、大脳皮質の発生においてミクログリアの異常は、細胞増殖や組織構築、神経投射に影響を及ぼし、さらには新生児、成熟期に活動量の亢進や社会的行動の異常といった行動異常の原因となる可能性を示した。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Newborn and embryo mice exposed prenatally to ethanol show abnormal behavior and morphological defects caused from abnormal activity of microglia in neocortex

○Komada M¹, Nagao T², Ikeda Y¹

¹Dev Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

²Dept Life Sci Fac Sci Engineering, Kinki Univ

Fetal alcohol spectrum disorders (FASD) consist of a wide range of mental, emotional, craniofacial, physiological, and immune disorders that arise from prenatal exposure to ethanol (EtOH). Prenatal exposure to EtOH affects neural stem cells and neurons during neocortical development and maturation. We evaluated the development and maturation of the neocortex of embryos, newborns, and adult mice prenatally exposed to 25% (w/v) EtOH, using histological and behavioral analyses. Pregnant ICR female mice were administered EtOH via intragastric gavage at a dose of 1 or 2 g/kg body weight twice daily on E6.5 through E18.5 to establish the *in vivo* FASD mouse models. Reduction of proliferation and excessive cell death were observed in the dorsal telencephalon on embryos. Abnormal neuronal distribution and layer formation affected dopaminergic neuronal projections in the neocortex. Behavioral tests revealed an increase in small movements in newborn mice, and adults showed hyperactive and abnormal social behaviors. Excessive microglial activation was observed in the neocortex at the developmental and postnatal periods. Abnormal expression of inflammation factors (cytokines, chemokines) and neurotrophic factor were induced in the neocortex on embryos and newborns. These data suggest that the FASD-associated abnormal behaviors resulted from morphological and functional abnormalities in the neocortex.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-5 新規 Cre マウスを用いた TRPS において多彩な先天性心奇形がみられる原因解析

○Nomir Ahmed^{1,2}, 竹内 優斗^{1,3}, 藤川 順司^{1,4}, 阿部 真土¹, 脇坂 聡¹

¹阪大 院歯 口腔解剖 1

²ダマンフル大 獣医学 解剖

³阪大 院歯 矯正

⁴阪大 歯病 障害歯

A novel transgenic mice explains pleiotropic congenital cardiac defects of TRPS patients

○Nomir A^{1,2}, Takeuchi Y^{1,3}, Fujikawa J^{1,4}, Abe M¹, Wakisaka S¹

¹Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Dept Anat Embryo, Fac Vet Med, Damanhour Univ

³Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

⁴Div Spec Needs Dent, Osaka Univ Dent Hospital

Purpose: Tricho-rhino-phalangeal syndrome (TRPS) exhibits an autosomal dominantly-inherited craniofacial and skeletal abnormality. Recent studies revealed that relatively high population of the TRPS patients exhibit congenital heart defects. To understand the etiology of these defects, we compared the localization of Trps1-daughter cells and actual Trps1 expression during cardiac development. **Materials & Methods:** 1. Generation of Trps1-Cre strain and fate mapping of Trps1-daughter cells Transgenic mouse containing approximately 4kb murine Trps1 proximal promoter sequence followed by Cre cDNA (Trps1-Cre) was generated. Trps1-Cre mice were crossed with Cre reporter strain (R26R) mice to identify Trps1-daughter cells in the cardiac regions. 2. *In situ* hybridization (ISH) and real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis ISH was performed on transverse cryosections. For the qPCR analysis, postnatal day 0 hearts were carefully separated into different cardiac regions. Trps1 relative expression was calculated by Hprt1 as normalizing gene. **Results & Conclusion:** X-gal labeled cells were observed in the endocardial cushion of the early embryonic stage. Later, extensive staining was observed in valves, aortic sinus, atrial walls, ventricular walls and also in the interventricular septum. Trps1 mRNA expression was regionally observed in the endocardial cushions of the outflow tract and later in the leaflets of all mature cardiac valves. Relative Trps1 expression correlated well with the ISH analysis that the pulmonary and aortic vessels regions had double quantity of Trps1 compared to the other heart regions. These results indicate that Trps1 might contribute not just to valve formation but also to development of broader cardiac region, and partially explain why TRPS patients exhibit various types of cardiac defects. (Non-member co-worker: Ashraf A. Elsharaby)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-6 フィジー共和国住民の上顎第一小臼歯サイズにおける性的二型について

○佐々木佳世子, 近藤信太郎

日大松戸歯 解剖

【目的】 上顎第一小臼歯は頬側と舌側の2咬頭から構成されており, それらの形成過程は個体発生学的にも系統発生学的にも異なる. しかし, 同一個体における各咬頭の形態変異量を定量的に研究した報告は少ない. そこで今回, 我々は咬頭のサイズを評価する新たな計測法を考案し, 上顎第一小臼歯における性的二型の分析を行った.

【資料と方法】 資料は南太平洋のフィジー諸島にあるビティレブ島の首都スバのセカンダリースクールの生徒 (11~19歳) の上顎歯列石膏模型 105 個体 (男 53, 女 52) である. デジタルノギスを用いて右側第一小臼歯を計測した. 計測項目は, 近遠心径 (MD), 頬舌径 (BL), 頬側の頬舌径 (B-BL), 舌側の頬舌径 (L-BL), 舌側咬頭の近遠心径 (L-MD), 咬頭頂間距離 (ICD) の6項目である. B-BL と L-BL は BL を, 中心溝と歯冠頬舌軸の交点で頬側と舌側に分けたものである. 各計測値の基本統計量を算出し, 男女の平均値間の差は t 検定を用いて検出し, 性差の程度は性差百分率によって比較した.

【結果と考察】 性差百分率は頬側咬頭より舌側咬頭のサイズ (L-BL と L-MD) に強く現れ, 平均値間の差は有意であった ($P < 0.05$). BL の性差は有意であった ($P < 0.05$) が, MD (頬側咬頭の近遠心径に相当する) と B-BL の性差は有意ではなかった. BL の性差百分率は舌側咬頭のそれと同程度であった. ICD の性差百分率は小さかった. 以上より, 上顎第一小臼歯では発生の遅い部位に性差が現れる傾向が強いことが明らかとなった. 大臼歯の研究において, 上顎では発生の遅い遠心の2咬頭 (Kondo et al., 2005), 下顎では発生の遅いタロニッド (Kondo and Townsend, 2004) に強い性差が現れる傾向があるとされており, 上顎第一小臼歯でも同様の結果が得られたと言えよう.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Sexual dimorphism of the maxillary first premolar sizes in Fijian population

○Sasaki K, Kondo S

Dept Anat, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

The purpose of the present study was to analyze the sexual dimorphism of the buccal and lingual cusp sizes in the maxillary first premolar. The mesiodistal diameters (MD), buccolingual diameters (BL), buccolingual diameter of the buccal and lingual cusps (B-BL and L-BL), mesiodistal distance of the lingual cusp (L-MD), and intercuspal distance (ICD) were measured on the right maxillary first premolar of the plaster casts (53 males and 52 females), which were obtained from Fijian secondary school students, by using a digital caliper. The boundary between B-BL and L-BL was defined as the intersection of the central groove with buccolingual crown axis. The lingual cusp diameters (L-BL and L-MD) and BL were significantly larger in males than in females ($P < 0.05$). On the other hand, the MD, B-BL and ICD did not show the sexual differences significantly. The MD was thought to be corresponded to the mesiodistal diameter of the buccal cusp. The percentage sexual dimorphism was greater in the diameters of the later-developed lingual cusp rather than in the early-developed buccal cusp.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-7 Guaiacol は三叉神経節ニューロンに作用し鎮痛効果を発揮する

○ 隴田みゆき, 木村 麻記, 佐藤 正樹, 東川明日香, 小島 佑貴, 田崎 雅和,
澁川 義幸

東歯大 生理

優れた鎮痛効果を有する guaiacol は歯内療法薬として用いられるが, その生理的効果は十分に解明されていない. 近年, 象牙芽細胞が感覚受容細胞であり, これには transient receptor potential (TRP) チャネルが関与していることが明らかになっている. そのうち TRPV1 チャネルは capsaicin の受容体タンパク質であるが, guaiacol は capsaicin と同じフェノール骨格を有し, 構造が類似している. そこで, 象牙芽細胞系細胞 (odontoblast lineage cells: OLCs) を用いて TRPV1 チャネルに対する guaiacol の作用について fura-2 を用いたカルシウムイメージング法で解析した. 細胞外 Ca^{2+} 存在下で OLCs に $0.9 \mu\text{M}$ guaiacol を投与すると細胞外から Ca^{2+} が流入し細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が増加した. Guaiacol と同時に TRPV1, V2, V4 チャネル antagonist を投与しても, guaiacol 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は抑制されなかったが, TRPV3 チャネル antagonist を同時投与すると抑制された. 200 mOsm/L の低浸透圧溶液 (標準細胞外液: 335 mOsm/L) を作製し, 細胞外 Ca^{2+} 存在下で OLCs に低浸透圧刺激を加えると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加した. 低浸透圧刺激と guaiacol の同時投与で低浸透圧刺激誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は抑制されなかった. 加えて, 低浸透圧刺激と TRPV3 チャネル antagonist を同時投与しても, 低浸透圧刺激誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は変化しなかった. Guaiacol は象牙芽細胞の TRPV3 チャネルに作用するが, 低浸透圧刺激誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を抑制せず, 象牙質痛に対する鎮痛効果は低いことが示唆された. そこで, guaiacol の歯髄ニューロンに対する作用を検討した. Wistar rat から急性単離して得られた三叉神経節ニューロンに 10 nM bradykinin を加えると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加した. その後, bradykinin と $0.9 \mu\text{M}$ guaiacol を同時投与すると, bradykinin 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は有意に減少した. 従って, guaiacol の歯痛に対する鎮痛効果は直接歯髄に作用し発揮されることが示唆された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Guaiacol shows analgesic effect by acting in rat trigeminal ganglion neurons

○ Shimada M, Kimura M, Sato M, Higashikawa A, Kojima Y, Tazaki M, Shibukawa Y

Dept Physiol, Tokyo Dent Coll

Guaiacol is used for endodontic treatment and has high analgesic activity. Odontoblasts play important roles in nociceptive function via the activation of transient receptor potential (TRP) channels in receiving the stimuli applied to the dentin surface. To elucidate the pharmacological effects of guaiacol in odontoblasts and rat trigeminal ganglion (TG) neurons, we measured the intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) by fura-2 fluorescence imaging. In the presence of extracellular Ca^{2+} , we observed transient $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases by application of $0.9 \mu\text{M}$ guaiacol in odontoblasts. Guaiacol-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were significantly inhibited by TRPV3 antagonist, not by the antagonists of TRPV1, TRPV2 or TRPV4 channels. Hypotonic stimulation (200 mOsm/L) increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$, while the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases are not sensitive to guaiacol. The application of 10 nM bradykinin increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in TG neurons. The bradykinin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase was significantly suppressed by guaiacol. These results suggested that guaiacol activates TRPV3 channels in odontoblasts, while have a remarkable inhibitory effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses in the TG neurons.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-8 ブタ歯髄細胞の不死化と象牙芽細胞分化に及ぼす BMP2 と TGF β の影響

○唐木田丈夫, 大井田新一郎, 山本 竜司, 齊藤 まり, 山越 康雄

鶴大 歯 生 化

外部刺激によって象牙芽細胞にダメージを受けると、歯髄細胞の一部が象牙芽細胞に分化し第三象牙質を形成することが知られているが、そのメカニズムはまだ完全に解明されていない。【目的】本研究では象牙質の再生メカニズムを解明する一環として、ブタ歯髄から分離した細胞を不死化し、象牙芽細胞の分化マーカーに及ぼす BMP2 と TGF β の影響を検討した。【方法】萌出前のブタ切歯の歯髄から分離した細胞にプラスミド pSV3-neo を導入し、G418 添加と限界希釈法を用いた培養で単一細胞由来のコロニーを採取した。得られたクローンはアルカリホスファターゼ (ALP) 活性の高いものと低いものが存在したので、両者の代表的なクローン C1 と C2 を選び BMP2 と TGF β に対する反応を検討した。象牙芽細胞のマーカーとなる象牙質シアロリンタンパク質 (DSPP) とそのプロセッシング酵素である BMP1 および MMP-20 の遺伝子発現は qPCR 法を用いて測定した。【結果と考察】 ALP 活性の高い C1 は BMP2 に反応せず、TGF β で抑制された。ALP 活性の低い C2 は BMP2 で促進され、TGF β で抑制された。DSPP と MMP-20 の遺伝子発現は C1 が C2 を上回った。BMP2 と TGF β を添加して 1, 3, 7 日目の遺伝子発現を測定したところ、C1, C2 ともに MMP-20 の発現が上昇した。BMP2 による MMP-20 の発現上昇は測定期間中続いたが、TGF β による発現上昇は 1 日目に限られた。C1 は C2 に比べて ALP 活性、DSPP と MMP-20 遺伝子の発現が高く、分化段階が象牙芽細胞に近いように思われる。また、骨芽細胞分化に対して BMP2 は促進的に、TGF β は促進と抑制の両方に働いている可能性が示唆される。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Cloning of immortal porcine pulp cells and BMP2- and TGF β -induced odontoblastic differentiation

○Karakida T, Oida S, Yamamoto R, Saito M, Yamakoshi Y

Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

When the primary odontoblasts are damaged by external stimuli, new odontoblasts are differentiated from dental pulp cells in order to form the tertiary dentin. This phenomenon is well known but the mechanism is still unclear. **Purpose:** We established cell lines from porcine dental pulp and examined the effects of BMP2 and TGF β on the odontoblastic differentiation. **Materials & Methods:** The cells isolated and transfected with SV40 large T-antigen were cloned by the limiting dilution method and 2 clones (C1 and C2) were subjected to the experiment. The effect of BMP2 and TGF β on the clones was examined in alkaline phosphatase (ALP) activity and gene expression of dentin sialophosphoprotein (DSPP) and processing enzymes of DSPP (BMP1 and MMP-20). **Results & Conclusion:** ALP activity of C1 with high basal level was decreased by TGF β and that of C2 with low basal level was induced by BMP2 and decreased by TGF β . Both DSPP and MMP-20 gene expression of C1 was higher than C2 in the untreated condition. Both BMP2- and TGF β -induced MMP-20 gene expression but the later has transient effect. Because of higher ALP activity and gene expression of DSPP and MMP-20, C1 may be in the late stage of odontoblast differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-9 象牙芽細胞の感覚受容機能発現に関する発生学的研究—第一報—

○田中 亜生, 澁川 義幸, 石川 昂, 田崎 雅和, 山本 仁, 新谷 誠康
東歯大 小児歯

【目的】象牙芽細胞は内エナメル上皮との上皮-間葉相互作用により歯乳頭の細胞から分化する細胞であり、象牙質を形成の他、感覚受容の機能を持つことが知られている。澁川ら(2015)は象牙芽細胞の感覚受容に、transient receptor potential (TRP) V4 チャネル, TRPA1 チャネル, pannexin 1 (PANX-1) チャネルが重要な役割を演じていることを示した。しかし、象牙芽細胞が感覚受容の機能をいつから獲得するかについては不明である。そこで本研究は、象牙芽細胞の感覚受容機能獲得について TRP チャネルや PANX-1 チャネルの発現から発生学的に明らかにすることを目的とし、その第一報としてラット下顎切歯における TRP チャネルの発現についての免疫組織化学的検索結果を発表する。【材料と方法】生後4週 of Wistar ラットを4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定後、下顎を摘出し10% EDTA で脱灰後、通法に従ってパラフィンに包埋した。歯乳頭細胞から象牙芽細胞への連続的な分化過程が観察できるように、切歯の4 μm の連続矢状断切片を作製し、H-E 染色と抗 TRPV4 抗体および抗 TRPA1 抗体を用いた免疫組織染色を行った。【結果と考察】抗 TRPV4 抗体と抗 TRPA1 抗体に対する陽性反応は共に apical bud 付近の象牙芽細胞分化前の歯乳頭細胞には観察されないが、象牙芽細胞への分化が進むにつれて反応が観察されるようになり、象牙質形成のみられる成熟した象牙芽細胞では強い免疫陽性反応が観察された。歯乳頭細胞や分化過程にある象牙芽細胞よりも成熟した象牙芽細胞で強く免疫陽性染色が観察されたことから、TRPV4 と TRPA1 チャネルは象牙芽細胞の象牙質形成能と強く関連することが示唆されるとともに、象牙芽細胞の感覚受容機能も象牙質形成能と同時期に出現することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The developmental studies on the differentiation into the odontoblasts as sensory receptor

○Tanaka A, Shibukawa Y, Ishikawa N, Tazaki M, Yamamoto H, Shintani S
Dept Pediatr Dent, Tokyo Dent Coll

It is generally thought that odontoblasts act as sensory receptor. However, it is still unknown from when odontoblasts act as sensory receptor during tooth development. Recently, Shibukawa et al. (2015) demonstrated that transient receptor potential (TRP) V4, TRPA1 and pannexin 1 (PANX-1) play an important role for the reception of the sense in odontoblasts. To clarify developmental process for the function of odontoblast as sensory receptor, we performed the expression of the TRP channels immunochemically as the first report. Fixed 4 week-old rat mandibles were dehydrated by 10% EDTA and embedding paraffin wax by conventional method. To observe odontoblasts which are in the process of different differentiation, sagittal sections of incisor were made for hematoxyline-eosin staining and immunohistochemistry with anti-TRPV4 and anti-TRPA1 antibodies. Although the dental papilla cells did not show immunoreaction of anti-TRPV4 and anti-TRPA1 antibodies, immunopositive reaction of both antibodies became strong during odontoblast differentiation. Mature odontoblasts which form dentin expressed the strong immunopositive reaction of both anti-TRPV4 and anti-TRPA1 antibodies. These findings suggest that TRPV4 and TRPA1 are involved in the formation of dentin and the sense reception function of odontoblasts may appear at time same as dentin formation ability.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-10 象牙質コラーゲン中の架橋型 AGEs の検出

○清水 真人, 三浦 治郎

阪大 院歯 総診

糖化反応は加齢変化の一つとして考えられている。糖化の一連の反応はメイラード反応とよばれ、酵素が関与せず不可逆的に反応が進行する。生体内に取り込まれた糖はタンパク質のリジン、アルギニン残基の側鎖と結合し、 Schiff塩基を形成する。その後、アマドリ転位、酸化反応等を経て不可逆的に糖化最終産物 (AGEs) となる。特にコラーゲンの分子間を架橋する架橋型 AGEs が組織に蓄積、沈着すると、コラーゲンが本来のしなやかさを失うため、組織が脆弱になる傾向にあることが知られている。象牙質は糖化ストレスに常に受ける環境にあり、ほとんど代謝しない。象牙質コラーゲンの糖化について、これまで、歯髄周囲における糖化の増加といった分布状態の差があることが報告されているが、年齢による差はほとんどないとされてきた。本研究では Western blot 法などの生化学的手法、コラーゲンの蛍光寿命測定といった物理化学的手法を用いて若年者、高齢者の象牙質を解析した。生化学的手法では付加型 AGEs の一つである CML と架橋型 AGEs であるペントシジンが、高齢者では若年者に比べて多いことを認めた。また蛍光寿命の短縮から、コラーゲン間の AGEs による非生理的な架橋が増加していることが示唆された。さらに象牙質コラーゲンを 6N-HCl で加水分解したのち、C18 逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システムと蛍光検出器によって、ペントシジンの検出を行った。その結果、若年者より高齢者の象牙質にペントシジンの量が多いことがわかった。象牙質中のペントシジンの詳細な分布を明らかにするため現在、微量試料での解析を進めている。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Detection of AGEs crosslinks in dentin collagen

○Shimizu M, Miura J

Div Interdisci Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent

The purpose of this study was to determine the Maillard reaction in dentin. We focused on the crosslinking of collagen; namely, Advanced Glycation End-products (AGEs) formed by non-enzymatic glycosylation. Time-resolved fluorometry and western blotting can be used as probes for this research. In this study, we examined the relationship between fluorescence characteristics and immunochemical analysis of type I collagen from decalcified human dentin with respect to glycation, and considered the possible influence of crosslinking on dentinal physiology. Fluorescence lifetime of the aged dentin was shorter than that of young dentin. There were also differences between young and aged dentinal collagen in western blotting. AGEs levels in aged dentin were higher than that in young dentin for collagen extracted with 3N HCl. Direct AGEs-crosslinks measurement of dentin hydrolysate with reversed phase HPLC system showed the aged dentin contained the large amount of pentosidine than young dentin. These findings suggest that the accumulation of AGEs with aging may be responsible for the changes in fluorescence lifetime and immunochemical properties. Fluorescence microscopy and electrophoresis can provide useful crosslinking information on the aging phenomenon in human dentin. Further, we will improve HPLC method for micro volume analysis to clarify distribution of pentosidine in dentin.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-11 硬骨魚類スポットドガーの顎歯エナメロイドでのエナメルタンパク様タンパクの出現と局在

○笹川 一郎¹, 横須賀宏之², 石山巳喜夫², 三上 正人³

¹日歯大新潟 先端研セ

²日歯大新潟 解剖 2

³日歯大新潟 微生物

エナメロイドは魚類の歯の表層を覆うエナメル質類似の高石灰化組織であるが、その発生過程より象牙質最表層に相当するとみなされる[1]。エナメロイドにおける、上皮細胞由来のエナメルタンパクの有無には議論があった[1, 2]。しかし、従来は光顕観察が主であり、電顕免疫組織化学によるエナメルタンパクの局在の検討は極めて少ない[2]。また、硬骨魚類の基幹の条鰭類スポットドガーでは、顎歯がカラーエナメル質を、鱗がガノイン層をそれぞれ有し、同じエナメルタンパク様タンパクを共有して類似の高石灰化層を形成することが示唆されている[3, 4]。今回、スポットドガー（成魚）のエナメロイド形成期歯胚において、哺乳類アメロゲニンに対する抗体を用い、電顕免疫組織化学を行った。材料は固定後水溶性樹脂に包埋し、protein-A gold 法で免疫染色を行い、光顕と透過電顕で観察した。石灰化期エナメロイド基質は陽性反応を示したが、形成期と成熟期では反応は見られなかった。石灰化期ではエナメロイド基質のコラーゲン線維に沿う位置と内エナメル上皮細胞中の顆粒に明瞭な免疫反応が認められた。今回の結果は、上皮由来のエナメルタンパク様タンパクがエナメロイド基質では石灰化期にのみ存在し、コラーゲン線維に沿う結晶の成長に関与することを示唆している。さらに、このエナメルタンパク様タンパクの分泌はエナメロイド石灰化期から始まり、カラーエナメル形成期に続き、エナメル質層を形成することが示された。[1] Sasagawa, I et al., (2013) J Oral Bio, 55, 76. [2] Ishiyama, M. et al., (2001) Arch Histol Cytol, 64, 99. [3] Sasagawa, I et al., (2014) Connect Tissue Res, 55, 225. [4] Sasagawa, I et al., (2016) J Exp Zool (Mol Dev Evol), in press.

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Immunohistochemical localization of enamel matrix protein-like proteins in tooth enameloid of spotted gars, *Lepisosteus oculatus*, a bony fish

○Sasagawa I¹, Yokusuka H², Ishiyama M², Mikami M³

¹Adv Res Cent, Nippon Dent Univ at Niigata

²Dept Histol, Nippon Dent Univ at Niigata

³Dept Microbiol, Nippon Dent Univ at Niigata

Enameloid is a well-mineralized tissue covering the tooth surface in fish, and may correspond to the outermost layer of dentin. There was a long debate on the existence of ectodermal enamel matrix proteins (EMPs) that are homologous to those of tetrapod's enamel in enameloid. However, only a few studies concerning TEM-based immunohistochemistry of the EMP-like proteins in enameloid were known. In order to examine the localization of EMP-like proteins in the enameloid, we subjected *Lepisosteus* tooth germs to TEM-based immunohistochemistry (PAG method) using anti-mammalian amelogenin antibodies. The positive immunoreactivity for the antibodies was found in the enameloid matrix during the mineralization stage, but was not found there during both formation and maturation stages. The immunolabeling was observed along the collagen fibrils in the mineralizing enameloid matrix, and in the granules of the inner dental epithelial (IDE) cells facing the enameloid. This suggests that the EMP-like proteins are contained in mineralizing enameloid, and are involved in crystal growth in enameloid. It is likely that the EMP-like proteins are secreted by the IDE cells during the period from the enameloid mineralization stage to the collar enamel formation stage.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-12 ヒト iPS 細胞から分化誘導させた神経堤細胞の特性

○鳥海 拓¹, 河野 英輔², 磯川桂太郎¹, 本田 雅規³

¹日大 歯 解剖 II

²日大 院歯

³愛院大 歯 口腔解剖

【目的】神経堤細胞は脊椎動物に特有な細胞群であり、顎顔面領域の発生に重要な役割を果たす。そこで、多能性幹細胞から神経堤細胞に分化誘導させることができれば、歯や顎骨などの顎顔面領域の再生医療にとって有益な細胞ソースになる。本研究では、胚性幹細胞から神経堤細胞への分化誘導法(Bajpai et al., 2010)を利用し、ヒト歯髄細胞から樹立した人工多能性幹(iPS)細胞を神経堤細胞へ分化させ、その特性を解析した。【材料および方法】日本大学歯学部倫理委員会承認のもと、7歳男児の上顎左側乳中切歯の歯髄間葉系細胞からiPS細胞を樹立した(倫許2010-8)。継代培養したiPS細胞をシングルセルとし、神経堤細胞誘導培地において8日間浮遊培養してニューロスフェア(NS)を作製した。その後、接着したNSから外生した細胞に対して、蛍光抗体法およびフローサイトメトリーで神経堤細胞マーカーの発現を解析し、さらに骨芽細胞およびシュワン細胞への分化誘導を試みた。【結果】接着したNSから外生した細胞は、蛍光抗体法で神経堤細胞マーカーのAP2- α , Nestin および p75NTR のいずれにも陽性、ES細胞マーカーのSSEA-4には陰性を示した。また、フローサイトメトリーで神経堤細胞マーカーのHNK-1, p75NTRの発現を認めた。さらに、骨芽細胞誘導下では、誘導21日目でアリザリンレッドS陽性部が検出され、シュワン細胞誘導下では、誘導5週目でシュワン細胞マーカーのGFAPおよびS-100陽性が、誘導10週目でMyelin P2陽性が蛍光抗体法で検出された。【考察】ヒト歯髄間葉系細胞から樹立したiPS細胞をBajpaiらの方法により誘導して得られた細胞は、神経堤細胞マーカーを発現し、骨芽細胞およびシュワン細胞へと分化する多分化能をもつことが示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Characterization of neural crest cells derived from human induced pluripotent stem cells

○Toriumi T¹, Kawano E², Isokawa K¹, Honda M³

¹Dept Anat, Nihon Univ Sch Dent

²Nihon Univ Grad Sch Dent

³Div Oral Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Neural crest cells (NCCs), unique to vertebrates, play a vital role in development of the oral and maxillofacial region. NCCs that have been differentiated from pluripotent cells are considered as a promising source of cells for regenerative medicine. In this study, we examined the differentiation of human induced pluripotent stem (hiPS) cells, which were generated from mesenchymal cells in human dental pulp, into NCCs by using a protocol for derivation from human embryonic stem cells into NCCs and characterized the resulting NCCs. The hiPS cells were dissociated into a single-cell suspension and then reaggregated for 8 days in low-cell-adhesion plates with a neural induction medium to form neurospheres. After these neurospheres had been transferred to fibronectin-coated dishes, cells migrated from the adherent neurospheres. Immunofluorescence and flow cytometric analyses showed that these migrated cells exhibited NCC markers. Furthermore, the migrated cells cultured in osteogenic and Schwann cell induction medium showed, respectively, Alizarin-red-positive nodules after 21 days and positive immunofluorescence with anti-GFAP and S-100 antibodies after 5 weeks in culture. These results suggest that the cells differentiated from hiPS cells by the protocol applied here expressed NCC markers, and have multilineage potential for osteogenic and Schwann cell differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-13 歯根膜線維芽細胞による破骨細胞制御機能に及ぼす咬合力の影響

○高橋 智美, 滝田 裕子, 牛島 夏未, 飯塚 正

北大 院歯 学術支援

【目的】歯槽骨の維持には破骨細胞による骨吸収が必須であり, その制御には咬合による歯根膜線維芽細胞への刺激が重要な役割を果たしている. 今回, 我々は咬合力を喪失した場合の歯根膜線維芽細胞による破骨細胞性骨吸収の制御について検討を行った. 【材料と方法】生後4週齢のWistar Ratの左側上顎臼歯を抜去し, 1週および3週後に下顎臼歯の歯根膜組織から細胞を分離培養した. 得られた細胞を, それぞれ咬合側および抜歯側の歯根膜線維芽細胞として実験に使用した. 抗RANKL, 抗OPG抗体による蛍光免疫染色を行い, ウェスタンブロッティング法によりRANKLおよびOPGの発現を確認した. また, それぞれの歯根膜線維芽細胞と破骨細胞前駆細胞との共存培養を行い, TRAP染色にて破骨細胞への分化・誘導能を比較検討した. 【結果・考察】咬合側および抜歯側の歯根膜線維芽細胞は, 蛍光免疫染色においてRANKL陽性, OPG陽性を示した. ウェスタンブロッティング法ではRANKLおよびOPGタンパクの発現が認められたが, 抜歯後3週では, 抜歯側歯根膜線維芽細胞でOPGの発現量が低下している傾向が認められた. 破骨細胞前駆細胞との共存培養では, 抜歯後1週および3週の咬合側と抜歯側, それぞれにおいてTRAP陽性細胞がみられたが, 抜歯後3週の歯根膜線維芽細胞を用いた共存培養では, 咬合側に比べて抜歯側で大型の破骨細胞が誘導される傾向が認められた. 以上のことより, 歯根膜線維芽細胞における破骨細胞制御因子の発現には咬合力が関与し, また, 咬合喪失期間の違いが破骨細胞の誘導能に影響している可能性が示唆された.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Effect of the occlusal stimuli on osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells

○Takahashi T, Takita H, Ushijima N, Iizuka T

Support Sec Educ Res, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Purpose: Occlusal stimulus is an essential factor for maintenance of the structural integrity of the periodontal ligament. The objectives of this study was to investigate the effects of osteoclastogenesis induced by periodontal ligament (PDL) cells. **Material and Methods:** PDL cells were isolated from lower molar teeth of Wistar rats which were treated with extraction of upper molar teeth in one side 1 or 3 weeks previously. Both occlusal and non-occlusal side, PDL cells were analyzed on molecules involved with osteoclastogenesis. In co-cultures of murine osteoclastic precursors (RAW 264.7) and PDL cells, the formation of multinucleated, TRAP positive cells were evaluated. **Result and Conclusion:** OPG expression of PDL cells in non-occlusal side obtained from 3weeks samples was slightly reduced on Western blotting compared to occlusal side. In addition, the number of osteoclasts and the size of cells were significantly augmented in non-occlusal side compared to occlusal side. These findings suggest that the occlusal stimuli on periodontal ligament strongly influence osteoclast differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-14 破骨細胞形成に対する脂質異常の影響

○大城希美子¹, 鍛治屋 浩², 岡本富士雄², 坂上 竜資¹, 岡部 幸司²

¹福歯大 口腔治療

²福歯大 細胞分子生物

【目的】 ペリオドンタルメディスンの観点からも脂質異常と歯周病の関連性が報告されている。今回、高脂血症罹患における歯周病誘発へのリスクファクターを検討する目的で、TLR (Toll like receptor) 活性化による酸化 LDL (low density lipoprotein) 受容体を介した破骨細胞形成への効果について検討した。**【材料および方法】** マウス骨髄細胞 (BMC) を M-CSF 刺激した骨髄マクロファージ (BMM) と Raw264.7 細胞を RANKL 刺激により破骨細胞へと分化させた。歯周病原菌である *P. g* 菌により活性化される TLR2 および TLR4 に対する ligand を用いてこれらの細胞を刺激し Western blot 法, real time PCR 法, TRAP 染色法を用いて破骨細胞形成に関連する分子の動態を検討した。**【結果および考察】** TLR2 及び TLR4 刺激で BMC から BMM への分化時に、酸化 LDL 受容体である LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) の発現が増加した。この BMM において、TLR 刺激により LOX-1 の下流シグナルである ERK1/2 のリン酸化が時間依存性に増加した。以上より歯周病原菌の感染により酸化 LDL 受容体の発現が上昇し、ERK1/2 活性化を介して RANKL 非依存性に破骨細胞が分化する可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effects of dyslipidemia on osteoclastogenesis

○Ohgi K¹, Kajiya H², Okamoto F², Sakagami R¹, Okabe K²

¹Dept Odontol, Fukuoka Dent Coll

²Dept Physiol Sci Mol Biol, Fukuoka Dent Coll

Periodontitis is a chronic disease that is one of the two major causes to lose a tooth with caries. Periodontal pathogens such as *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) have been identified in bacteremias and atherosclerotic plaques in humans and it accelerates atherosclerosis in Apo E deficient mice. It has been reported that improved clinical periodontal condition reduced the progression of carotid atherosclerosis. Mouse bone marrow cells (BMCs) stimulated with M-CSF to bone marrow macrophage (BMM) and Raw264.7 cells stimulated RANKL to osteoclasts were used. These cells were stimulated with TLR (toll like receptor) 2 and TLR4 which were ligands of *P. g*, and investigate molecule of osteoclasts differentiation marker. Expression of LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) which was receptor of oxLDL (low density lipoprotein) were increased when BMC was stimulated with TLR2 and TLR4. The results suggest that the TLR-dependent upregulation of LOX-1 was considered to have potential to differentiate into mature osteoclasts with RANKL-independent through the activation of ERK1/2.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-15 多孔質性カルシウム製材に浸透させた新規合成ペプチドの動態

○富永 和也¹, 竹内 友規², 本田 秀太², 岡村 友玄¹, 和唐 雅博¹, 西川 哲成³, 田中 昭男¹

¹大歯大 口腔病理

²大歯大 院歯 病理

³大歯大 歯医学教育開発

エナメル基質蛋白をラット背部皮下に注射すると7日目に軟骨が形成され、その軟骨周囲に多数の好酸体が出現する。この好酸体をMALDI-TOF MS分析して得られたアミノ酸配列と同じ配列をもつペプチド(Pep)を人工的に作製し、ラット背部にアルジネート印象材と混和して徐放性を付与して皮下注射すると、骨と軟骨とが形成されるが、徐放性がない場合は7日程度で完全吸収される。そのため、さらに長期に亘り徐放性を有するスキャホールドが必要である。現在、多孔質性カルシウム製材(C)にアルブミン(Alb)を浸透させてCのAlb徐放性について*in vitro*で検討した。Cは5日目まで経日的にAlbを徐放したが、その後14日目まで徐放される量は極端に低下した。Cに浸透させたペプチドやタンパク質は約5日でCから放出され尽くしてしまうことが考えられる。今回、Pepに対するモノクローナル抗体を作製し、Pepを浸透させたCをラット背部に皮下注射し、Pepの動態を免疫組織学的に観察した。その結果、1週間後には、C自体や周囲組織、とくに血管内皮細胞、Cを貪食した巨細胞にPep抗体が陽性を示した。2週間後には、C内の深部にPep抗体が陽性を示したが、周囲組織におけるPep抗体の反応性は1週間後の組織と比較すると減弱した。すなわち、Cに浸透させたPepは、1週間までCの表層部から組織へ溶出し、その後はCの深部にPepが留まることで、周囲組織に緩やかに除放されると示唆される。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Synthetic oligopeptide kinetics in porous calcium materials

○Tominaga K¹, Takeuchi T², Honda S², Okamura T¹, Wato M¹, Nishikawa T³, Tanaka A¹

¹Dept Oral Pathol, Osaka Dent Univ

²Pathol, Osaka Dent Univ Grad Sch Dent

³Inno Dent Edu, Osaka Dent Univ

Enamel matrix derivative was cutaneously injected into the backs of rats, forming cartilage and eosinophilic round bodies. The bodies were analyzed, and found to comprise a seven-amino acid sequence. Novel peptide (Pep) having the same sequence was synthesized. As the peptide without extended-release cutaneously injected in the backs was absorbed entirely, the sustained-release is needed. We focused on porous calcium materials (PC) as an extended-release scaffold. In this study, monoclonal antibody was made to detect Pep, PC-saturated Pep was cutaneously injected into the backs of rats, and the backs were observed immunohistochemically. The antibody reacted to PC, with back tissue around the PC, especially vascular endothelia and giant cells, phagocytizing the PC at 7 days. The reaction to the antibody was localized at the central part of the PC at 14 days, and the reaction to the antibody in the back tissue around the PC was weaker at 14 days than at 7 days. It is suggested that Pep saturated in PC eluted from the surface layer of the PC at about 7 days, and Pep then stayed at the central part of the PC for extended-release.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-16 咬合性外傷時の歯周組織における幹細胞関連ケモカイン SDF-1 と CXCR4 の発現相関

○後藤加寿子¹, 鍛治屋 浩², 堤 貴司³, 岡部 幸司²

¹福岡医短 歯科衛生

²福歯大 細胞分子生物 細胞生理

³福歯大 咬合修復 有床義歯

歯槽骨の形態維持には適度な咬合力が不可欠であるが、一方で過剰な咬合力は歯牙動揺や歯槽骨吸収を伴う咬合性外傷を誘発する。歯周炎や歯牙矯正時において骨吸収時にケモカインの関与が示唆されているが、咬合性メカニカルストレス(MS)で誘発されるケモカインと骨質維持との関係は明らかでない。我々はこれまでに、*in vivo* と *in vitro* 咬合性外傷モデルを作製し、間欠的なメカニカルストレス(iMS)は歯根膜組織からのケモカイン産生を増加させ歯槽骨吸収を誘発すること、同時に iMS に対し種々の異なる COL 線維の産生を増加させ、外傷を防御することを報告した。今回、iMS による歯根膜組織の過剰ストレス防御反応としてのケモカイン産生や局在の変化について検討を行った。ヒト歯根膜細胞へ間欠的伸張刺激(iMS)を与えた場合のケモカイン発現を網羅的に検索した結果、刺激2日目において幹細胞維持に関与する SDF-1 の減少が認められた。一方、*in vitro* 咬合性外傷モデルのマウス歯根膜細胞を用い iMS による経時変化を観察すると、SDF-1 発現は iMS 依存性に3日目以降で、その mRNA とタンパク質の発現が有意に増加した。次に *in vivo* 咬合性外傷モデルにおいて、MS により根分岐部の歯根膜周囲組織に SDF-1 の発現が認められた。また、SDF-1 受容体である CXCR4 の発現も骨髄・歯髓組織に認められ、刺激後4日目で一過性に増大した。これらのことより過剰なメカニカルストレスにより歯根膜組織から SDF-1 が分泌され、これが間葉系幹細胞の受容体 CXCR4 に結合することが骨芽細胞の維持や誘導に連動することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Relationships between the expression of SDF-1 and CXCR4 in the periodontal tissues using hyperocclusion model mice

○Goto K¹, Kajiya H², Tsutsumi T³, Okabe K²

¹Dept Dent Hygiene, Fukuoka Coll of Health Sci

²Div Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll

³Div Removal Prosthodont, Fukuoka Dent Coll

Mechanical stress (MS) during hyperocclusion has been shown to result in disappearance of the alveolar hard line, enlargement of including bone resorption and tooth loss, leading to occlusal traumatism. Several studies have also reported that MS induced the expression of cytokines in alveolar bone resorption during periodontitis and orthodontic tooth movement. However, little is known about the effect of hyperocclusal intermittent MS (iMS) on the expression of chemokines and maintenance of bone remodeling and quality. We examined the expression and localization of force-defensive chemokines in periodontal ligament (PDL) tissues using *in vivo* and *in vitro* hyperocclusion models. The iMS in human PDL cells gradually decreased SDF-1 gene, a self-renewal chemokine of stem cells, on day2 using DNA microarray. In vitro hyperocclusal model, the expression of SDF-1 was significantly upregulated day 3 after iMS in periodontal tissues. The iMS induced the expression of SDF-1 in the root branch in PDL and CXCR4 a SDF-1 receptor in dental pulp and bone marrow on day 4 using *in vivo* hyperocclusal model mice. The results suggest that the iMS-induced SDF-1 in PDL cells bound to CXCR4 in bone marrow cells, resulting in self-renewal in osteogenesis to hyperocclusal MS.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-17 Advanced Platelet-rich fibrin (A-PRF) を用いた歯槽骨再生療法の微小循環変化について

○松尾 雅斗, 奥寺 俊允, 山本 麗子, 東 雅啓

神歯大 口腔科学 歯科形態

【目的】多血小板フィブリン(Advanced Platelet-rich fibrin : A-PRF)は各種成長因子が含まれ、血管新生や骨組織再生の促進が期待されている。また、自己血から採取された安全性の高い物質であるとともに、ゲル状の賦形性を有する物質であることから骨再生の足場となるとも考えられている。本研究では骨形成時の微小循環変化に焦点をあて検討を行なった。【方法】本研究は神奈川歯科大学実験動物指針に基づいて行われ、同動物倫理委員会の審査合格後に開始した。ビーグル犬6頭を用い、右側前臼歯を抜去し実験群とし抜歯窩中にA-PRFを密に充填した。また、反対側は抜歯のみの対照群とした。術後14, 30日後に下顎歯血管樹脂注入を行い、骨付着血管鑄型標本作製した。また上顎歯槽窩は免疫組織標本作製し血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現を観察した。【結果と考察】血管鑄型標本では対照群において14日後、抜歯窩は既存骨に沿って多孔性の骨新生が観察された。抜歯窩中央部に明確な骨組織は見られず新生毛細血管網が観察された。30日後、抜歯窩中央部にも多孔性の骨新生がみられた。菲薄な再生骨梁が不規則に走行し抜歯窩内の均一な骨形成は見られなかった。再生骨梁中に骨髓血管網が走行しているのが観察された。実験群では、14日後、抜歯窩内は密な多孔性の新生骨で満たされていた。抜歯窩中央部は対照群に比較して骨新生が進行しているのが観察された。30日後、対照群より明確で緻密な骨梁形成がみられ、骨髓の血管網も規則的なものとなっていた。免疫組織標本の観察でVEGFの発現は術後14日対照群の抜歯窩中央部において明確に観察された。【結論】本実験結果より実験群では、14日後に血管新生は終わり抜歯窩内まで新生骨が観察された。A-PRFを応用することで、抜歯窩の治療過程が促進されることが示唆された

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Microvascular changes of alveolar bone after application of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF)

○Matsuo M, Okudera T, Yamamoto R, Tou M

Dept Oral Sci Div Dent Anat, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

Introduction: Application of Platelet-rich fibrin (A-PRF) is expected to use the one of the bone regeneration therapy. In this study, regeneration processes of microcirculation and alveolar bone are observed under morphological analysis. **Methods:** The use of six beagle dogs was in accordance with the Animal Care Committee guidelines of our institution. Both mandibular premolars were extracted. Then PRF, which made for own experimental animal was applies to the one side of dentition. Another side is used to the control without A-PRF. After 14 and 30 days, synthetic resin were injected. The specimens were examined by scanning electron microscope. And vascular endothelial growth factor (VEGF) were examined under fluorescence microscope. **Results:** After 14 days in control group, few bone formation was observed along the pre-existing bone. Blood vessels were occupied in the center part of the socket. 30 days after, socket was filled with irregular porous new bone. 14 days after in A-PRF group, socket was filled with porous new bone.. 30 days after, socket was filled with remarkable new bone. Blood vessels of bone marrow was regenerated. **Conclusion:** These results suggest that A-PRF promoted the vascular regeneration and acceleration of bone formation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-18 Advanced Platelet-rich fibrin (A-PRF) を用いた歯槽骨再生療法の組織学的研究

○奥寺 俊允¹, 東 雅啓¹, 三好代志子², 高垣 裕子², 山本 麗子¹, 松尾 雅斗¹

¹神歯大 院歯 口腔科学・歯科形態

²神歯大 院歯 口腔科学

【目的】歯槽骨再生療法は失われた顎骨を増大する治療法として用いられてきた。近年、改良型多血小板フィブリン(Advanced Platelet-rich fibrin : A-PRF)を適応することで速やかな骨形成が得られることがわかってきた。A-PRFには各種成長因子が含まれており、血管新生や骨組織再生を促進する効果があると考えられている。また、同様の目的を持つ多血小板血漿(PRP)と比較すると密なゲル状を呈するため骨造成の足場としての可能性も期待される。本研究では骨形成プロセスについて形態学的手法を用いて検討を行なった。【方法】本研究は神奈川歯科大学実験動物指針に基づいて行われ、同動物倫理委員会の審査合格後に開始した。全身麻酔下においてビーグル犬6頭を用いた。右側前臼歯を抜去し実験群とし抜歯窩中にA-PRFを密に充填した。また、反対側は抜歯のみの対象群とした。両群とも歯肉弁は緊密に縫合を行った。手術後14, 30日後にHE組織標本および、免疫組織学的観察を行った。同時にマイクロCT撮影により抜歯窩中の骨新生率を測定した。【結果と考察】骨新生率は14日, 30日ともに対照群よりも実験群で高値を示した。HE組織標本による観察では対照群では術後14日に抜歯窩中に周囲既存骨から幼弱な骨再生が始まっていた。しかし抜歯窩中央は血餅で満たされ骨形成量は少なかった。実験群では14日後に抜歯窩内は中央部に至るまで幼若骨で満たされていた。対照群では骨再生は30日後に骨梁形成が見られた。骨梁は再生途上にあり配列は部分的であった。実験群では30日後, 骨再生は進み、放射状に配列する骨梁が観察された。免疫組織化学的観察では, 30日の実験群において, 対照群よりもOsteocalcin, Osteopontinの発現を多く認めた。【結論】これらの結果より, A-PRFを骨欠損部に適応すると, 骨新生が明確に促進することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Histological study of alveolar bone regeneration after application of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF)

○Okudera T¹, Tou M¹, Miyoshi Y², Takagaki-Mikuni Y², Yamamoto R¹, Matsuo M¹

¹Dept Oral Sci · Div Dent Anat, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

²Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

Introduction: Advanced Platelet-rich fibrin (A-PRF) is expected to use the one of the bone regeneration therapy. In this study, regeneration processes of alveolar bone is observed under morphological analysis.

Methods: The use of experimental animals were in accordance with the Animal Care Committee guidelines of our institution. Premolars of six beagle dogs were extracted. Right side is used to the experimental side, A-PRF by own made into the each extraction socket. At 14, 30 days after, The sections were observed under Light and Fluorescence microscope. The bone formation ratio and vascular regeneration ratio was measured by image programs. **Results:** 14 days after, In the control group, few newly formed bone was observed along the pre-existing bone. In the A-PRF group, the socket is filled in the newly formed bone up to the center part. 30 days after, The inside the socket was filled with newly formed in both groups. However, in the A-PRF group, thick and regular bone trabeculae were arranged. The bone formation ratio of the A-PRF group was significantly higher than the ratio of the untreated group in fourteen and thirty days after surgery. **Conclusion:** These results suggest that A-PRF promoted the bone formation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-19 hPDL 細胞中の内在性 TGF- β に対する Er:YAG レーザーの照射効果

○小林 一行¹, 丹羽 堯彦², 山川駿次郎³, 齊藤 まり⁴, 山本 竜司⁴, 山越 康雄⁴

¹鶴大短大 歯科衛生

²鶴大 歯 歯周病

³鶴大 歯 歯内療法

⁴鶴大 歯 生化

Er:YAG レーザー照射は創傷治癒や再生治療に有効であることが報告されているが、その作用機序については不明な点が多い。【目的】我々は生理活性物質であるトランスフォーミング成長因子ベータ(TGF- β)に注目し、歯根膜由来培養細胞(hPDL 細胞)中の内在性 TGF- β に及ぼす Er:YAG レーザー(レーザー)照射の効果について調べた。【方法】TGF- β I 型受容体の阻害剤である SB431542(SB)を未添加または添加した hPDL 細胞にレーザー照射(50mJ \cdot 10pps \cdot スウィーピング モーション \cdot 照射距離 2 cm)を行い培養後、3 日目と 7 日目に ALP 活性の測定および MTS アッセイを行ってレーザー照射に対する TGF- β 活性の影響および細胞増殖能を評価した。さらにレーザー照射による TGF- β の活性化に関与するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)を調べるためリアルタイム PCR、ザイモグラフィを行った。また潜在型 TGF- β (latent TGF- β) にレーザーを直接照射したものを hPDL 細胞に添加し、TGF- β の活性化について調べた。【結果】hPDL 細胞にレーザーを照射することで ALP 活性が上昇し、SB 添加群は未添加群に比べその活性は著しく低かった。MTS アッセイにおいてレーザー照射直後は未照射群に比べて細胞数は少なかったが、3 日目で未照射群の値を上回っていた。MMP の発現は 3 日目で強く認められたが、レーザー照射によって直接 pro MMP を活性化することはできなかった。またレーザー照射した latent TGF- β による hPDL 細胞に対する ALP 活性の上昇も認められなかった。【結論】レーザー照射は hPDL 細胞中の latent TGF- β を直接的には活性化しないが、レーザー照射によって発現の上昇が認められた MMP が TGF- β の活性化に関与する。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effect of Er:YAG laser irradiation for TGF- β in cultured human periodontal ligament cells

○Kobayashi K¹, Niwa T², Yamakawa S³, Saito M⁴, Yamamoto R⁴, Yamakoshi Y⁴

¹Dept Dent Hyg, Tsurumi Jr Coll

²Dept Periodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Endodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

⁴Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Although Er:YAG laser has been reported to enhance wound healing, the mechanism of action is unclear. **Objective:** In the present study, the effect of Er:YAG laser irradiation for TGF- β in cultured human periodontal ligament (hPDL) cells were investigated. **Methods:** Action of TGF- β by Er:YAG laser irradiation (50mJ, 10pps) was evaluated by the determination of ALP activity in hPDL cells with or without the addition of SB431542 (SB) and cell proliferation was determined by MTS assay. Gene expression and characterization of MMPs enhanced in hPDL cells by laser irradiation were analyzed by qPCR and zymography, respectively. The activation of TGF- β was investigated by determining ALP activity in hPDL cells enhanced by the latent TGF- β after laser irradiation. **Results:** The ALP activity was dramatically increased by laser irradiation under the condition without the addition of SB. MTS assay showed that cell numbers of laser irradiation group was higher than those of non-irradiation group at day 3. ALP activity of laser irradiated-latent TGF- β in hPDL cells was not increased. The expression of MMPs was markedly greater at day 3, however, proMMP was not directly activated by laser. **Conclusion:** TGF- β is activated by MMPs enhanced in hPDL cells by laser irradiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-20 ナトリウム依存性リン酸共輸送担体 (Pit-1, Pit-2) はヒト歯根膜線維芽細胞の石灰化物形成に必須である

○石川美佐緒¹, 糸日谷佳菜子², 高野 吉郎², 中村 芳樹², 下田 信治¹

¹鶴大 歯 口腔解剖

²鶴大 歯 矯正

【目的】 Pit-1 および Pit-2 の 2 つのアイソフォームが存在するナトリウム依存性リン酸共輸送担体は体内の多くの組織に発現し、無機リン酸の再吸収量を調節し、細胞の分化にも関与していると報告されている。歯根膜線維芽細胞は骨芽細胞やセメント芽細胞に分化するとされ、多能性を示す特異的な線維芽細胞である。本研究は、ヒト歯根膜線維芽細胞の石灰化物形成における Pit-1 と Pit-2 の発現ならびに機能について検討した。**【方法】** ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDLc) (Lonza 社) の通常培養を行い、Pit-1 と Pit-2 の発現について RT-PCR と Western blotting にて検討した。また、免疫組織化学的染色にてそれらの局在を観察した。hPDLc を石灰化物形成培地とナトリウム依存性リン酸共輸送担体阻害薬 (PFA) を添加し 28 日間培養を行い、石灰化物形成過程での細胞内 Pi 濃度変化とナトリウム依存性リン酸共輸送担体の関与について検討した。**【結果と考察】** hPDLc に遺伝子・タンパク質レベルでの Pit-1 と Pit-2 の発現を認めた。また、免疫組織化学的染色においても強い発現が観察された。hPDLc の石灰化物形成培地に PFA 添加を行うと、細胞内へのリン酸輸送が抑制され、石灰化物は観察されなかった。ヒト歯根膜線維芽細胞の石灰化物形成にナトリウム依存性リン酸共輸送担体 (Pit-1, Pit-2) が重要な役割を果たしていることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Sodium-dependent phosphate cotransporters, Pit-1 and Pit-2, are essential in the calcification by human periodontal ligament cell

○Ishikawa M¹, Itohiya K², Takano Y², Nakamura Y², Shimoda S¹

¹Dept Oral Anat, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Pit-1 and Pit-2 are the sodium-dependent phosphate cotransporter of Pi absorption in most of the cells, which have been studied in human, rat and mouse. The periodontal ligament cells have an ability to differentiate into osteoblasts and cementoblasts. The aim of this study was to investigate the role of Pit-1 and Pit-2 in the calcification by human periodontal ligament cells (hPDLc). Expression of Pit-1 and Pit-2 mRNA from two different donors were examined by RT-PCR. Pit-1 and Pit-2 proteins were examined by Western blotting. Localization of Pit-1 and Pit-2 was examined by immunohistochemistry. Phosphonoformic acid (PFA) was used to inhibit the Pi transporters. Time-course assay of Pi uptake was performed. The Pit-1 and Pit-2 were stably expressed in the hPDLc at mRNA and protein levels. Pi uptake in hPDLc was inhibited by PFA, and the calcification was not observed. The results indicate that Sodium-Dependent Phosphate Cotransporters, Pit-1 and Pit-2, are essential in the calcification by hPDLc.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-21 ヒト歯肉線維芽細胞への S-PRG フィラー溶出液を用いた実験における至適濃度の検討

○井上 博¹, 合田 征司², 西川 泰央¹

¹大歯大 生理

²神歯大 院歯 口腔科学

【目的】 S-PRG (surface reaction-type pre-reacted glass-ionomer) フィラーは、Na⁺(ナトリウムイオン)、F⁻(フッ化物イオン)、Al³⁺(アルミニウムイオン)、BO₃³⁻(ホウ酸イオン)、Sr²⁺(ストロンチウムイオン)とSiO₃²⁻(ケイ素イオン) 6種類の徐放能を有する腐蝕抑制効果の高い材料として知られている。しかし、S-PRG フィラー溶出液の生体親和性については不明な点が多い。今回我々は、ヒト歯肉線維芽細胞に対する S-PRG フィラー溶出液の影響を検討した。**【方法・結果】** S-PRG フィラーを MEM- α に懸濁して各種イオンを溶出させた。その上清をろ過して作製した培養液を S-PRG フィラー溶出液 (S-PRG) とした。S-PRG に各種濃度 (0, 2, 5, 10, 20%) の FBS を加えて 3 日間培養し、細胞増殖能を Cell Counting Kit-8 にて検討した。対照群は 10% FBS/MEM- α とした。その結果、S-PRG に細胞増殖能は認められなかった。同様に 3 日間培養後の細胞を 0.4% トリパンプルー染色液で染色したところ、各種濃度 S-PRG にて細胞死を確認した。次に S-PRG を MEM- α で 11 段階に希釈した系列 (1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1,000, 1/2,000, 1/5,000, 1/10,000) の溶液を作製し 10% FBS を加えて細胞増殖能を同様に検討した。その結果、1/100 以上に希釈した溶液においては対照群と同様の細胞増殖能を示した。**【考察】** 以上の結果から、S-PRG フィラー溶出液は原液のままではヒト歯肉線維芽細胞の増殖能に対して為害性を示すが、1/100 以上に希釈することにより為害性がなくなることを確認した。ヒト歯肉線維芽細胞に対する S-PRG フィラー溶出液の影響を検討するにあたっては 1/100 以上に希釈した S-PRG フィラー溶出液を用いるのがよいと示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Study of optimal concentration in the experiments with S-PRG filler eluate to human gingival fibroblasts

○Inoue H¹, Goda S², Nishikawa Y¹

¹Dept Physiol, Osaka Dent Univ

²Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

The S-PRG filler is known to have a high cariostatic effect material and to release 6 ions (Na⁺, F⁻, Al³⁺, BO₃³⁻, Sr²⁺ and SiO₃²⁻). In this study, we examined the effect of S-PRG filler eluate to human gingival fibroblasts (HGF). HGF were incubated for 3 days in the S-PRG filler eluate containing various concentrations of FBS (0, 2, 5, 10, 20%). The control group was MEM- α containing 10% FBS. As a result, cell proliferation was not observed by the S-PRG filler eluate. In the same way, HGF were cultured for 3 days and then stained with 0.4% trypan blue to test cell viability. We confirmed cell death in various concentrations of S-PRG filler eluate. Next, we dilute the S-PRG filler eluate to 11 steps with MEM- α (1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1,000, 1/2,000, 1 / 5,000 and 1/10,000) containing 10% FBS. As a result, in the solution diluted to 1/100 or more showed a cell proliferation similar to the control group. These data suggest that it is preferable to use the S-PRG filler eluate diluted to 1/100 or more in the experiments with S-PRG filler eluate to HGF.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-22 Wheat Germ Agglutinin (WGA)によるヒト歯根膜線維芽細胞由来オキシタラン線維の検出の検討

○鴨頭奈央子¹, 藤田 隆寛¹, 中島 一記¹, 松田 裕子¹, 畠山 純子³, 畠山 雄次²,
沢 禎彦², 石川 博之¹

¹福歯大 矯正

²福歯大 機能構造

³福歯大 保存

【目的】 歯根膜において弾性系線維はオキシタラン線維のみ存在するが、他の弾性系線維と異なり微細線維から構成される。糖タンパクである Fibrillin-1 は微細線維の主要な構成要素であるが、その糖鎖には様々な糖が結合している。そこで、我々は Wheat Germ Agglutinin (WGA) を用いてマウス歯根膜およびヒト歯根膜線維芽細胞におけるオキシタラン線維の検出を試みた。**【方法】** 1, 2 および 4 週齢マウス下顎臼歯歯根を固定および脱灰後、通法に従いパラフィン切片を作製した。各週齢のパラフィン連続切片に HE 染色, レゾルシン・フクシン染色および WGA 染色を行った。またヒト歯根膜由来線維芽細胞を 4 週間培養し, WGA および Fibrillin-1 免疫染色を行った。**【結果と考察】** 2 週齢マウスの歯根膜において歯根膜主線維の走行と直交する WGA 陽性線維状構造物が認められ, この線維状構造物は歯頸部において無細胞セメント質に向かい屈曲していた。4 週齢マウスにおいても WGA 陽性線維状構造物が歯根膜全体を縦断していた。これらの線維状構造物はレゾルシン・フクシン染色で陽性であった。1 週齢マウスの歯小囊ではこれらの線維状構造物は認められなかった。ヒト歯根膜細胞培養において, WGA レクチンおよび Fibrillin-1 抗体と二重染色により WGA および Fibrillin-1 の両方に陽性な線維状構造物が認められた。これらのことから WGA はマウスおよびヒト歯根膜におけるオキシタラン線維検出に有用である可能性が示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The detection of oxytalan fiber produced human periodontal ligament cells using Wheat Germ Agglutinin

○Kamogashira N¹, Fujita T¹, Nakashima K¹, Matsuda Y¹, Hatakeyama J³, Hatakeyama Y²,
Sawa Y², Ishikawa H¹

¹Div Orthodont, Fukuoka Dent Coll

²Div Funct Struct, Fukuoka Dent Coll

³Div Oper Dent Endod, Fukuoka Dent Coll

In human periodontal ligament contain only oxytalan fibers, which are elastin-free fibers and bundles of pure microfibrils. Fibrillin-1 is major component of microfibril and is one of glycoprotein binding various sugar chain. This study attempt to detect the oxytalan fibers in mouse periodontal tissue and human periodontal ligament cells by using Wheat Germ Agglutinin (WGA). Serial paraffin sections were made from mandible molar dental root at one, 2-, 4-week-old mouse following fixation and decalcification. These serial sections were stained with haematoxylin-eosin (HE), resorcin-fuchsin and WGA lectin. Human periodontal ligament cells were performed double-staining using WGA lectin and Fibrillin-1 antibody after 4 weeks culture. In 2-week-old mouse WGA positive fiber-like structures were observed in periodontal ligament and its directed to acellular cementum in cervical part of periodontal ligament. In 4-week-old mouse WGA positive fiber-like structures direct to longitudinally in periodontal ligament. These WGA positive fiber-like structures were stained with resorcin-fuchsim staining. In human periodontal ligament cell culture fiber-like structures were observed using WGA lectin and Fibrillin-1 antibody double staining. These results indicates that WGA lectin would be useful for detection of oxytalan fibers derived from mouse and human.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-23 マウス胎仔唾液腺の発生過程における転写共役因子 YAP の分子機能解析

○北川 道憲, 廣野 力, 杉田 誠

広大院医歯薬保 口腔生理

Hippo シグナル伝達経路は様々な生体組織において細胞増殖・分化を制御することが知られている。唾液腺においても同シグナル伝達経路において中心的役割を果たす YAP/TAZ タンパク質の発現が確認されており、細胞増殖への関与が報告されているが、胎生期における機能は明らかでない。過去の本学会において、*ex vivo* でのマウス胎仔由来唾液腺組織培養系と膜透過型モルフォリノを用いた YAP タンパク質の翻訳抑制による唾液腺組織の増殖抑制を報告したが、細胞増殖に関与する分子メカニズムは不明であった。そこで本研究では、胎生期唾液腺組織における YAP タンパク質の分子機能を解析し、唾液腺の発生過程における役割を解明する事を目的とした。YAP タンパク質翻訳抑制下において、既知の下流標的遺伝子の発現変動を解析したところ、幾つかのアポトーシス関連遺伝子に発現量増加が確認され、PI 染色した唾液腺組織細胞の細胞周期解析においても sub-G1 分画の増加が見られた。また、組織切片の活性化型 Caspase-3 免疫染色・TUNEL 解析により、YAP タンパク質の翻訳抑制が間葉組織におけるアポトーシスを亢進することが明らかとなった。YAP タンパク質は他の組織において Foxo1 を介した抗酸化機能への関与が報告されていることから、組織培養液中の抗酸化物質アスコルビン酸を除去したところ、YAP タンパク質抑制による活性化型 Caspase-3 の発現量が増強されることを確認した。しかし、既知の抗酸化遺伝子の発現量には抑制が見られず、YAP タンパク質を介した未知の抗酸化分子機構の存在が示唆された。以上の結果から、胎児期唾液腺の間葉組織において YAP タンパク質は抗酸化機能に関与し、酸化ストレスによるアポトーシスを抑制していると考えられる。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Functional analysis of transcriptional co-factor YAP during salivary gland development in mice

○Kitagawa M, Hirono C, Sugita M

Dept Physiol Oral Physiol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Hippo signaling pathway is known to regulate cell proliferation and differentiation in various tissues. YAP/TAZ proteins, pivotal regulators of Hippo pathway, are expressed in salivary gland and suggested to be involved in cell proliferation. We previously reported that repression of YAP protein translation in salivary gland derived from fetal mice resulted in decreased tissue growth in *ex vivo* culture system, although the molecular mechanism was unclear. In this study, we sought to investigate the molecular function of YAP protein during salivary gland development. Quantification of gene expression revealed that the expressions of several pro-apoptotic genes were enhanced and sub-G1 fraction of PI-stained salivary gland tissue cells was increased. We confirmed that activated Caspase-3 protein and TUNEL positive cells were increased in mesenchymal area of salivary gland. We also observed that depletion of ascorbic acid from tissue medium enhanced the increase of activated Caspase-3. However, the expressions of known antioxidant genes were not changed under YAP repression, suggesting unknown antioxidative mechanism with YAP protein. Our data suggest that YAP protein has an antioxidative role in mesenchymal tissue of developing salivary gland and suppress apoptosis induced by oxidative stress.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-24 EGF/ErbB/ERK は Shh/Ptch/Gli システムを介して顎下腺の分枝形態形成を調節する

○水越 堅詞, 小山 典子, 柏俣 正典

朝日大 歯 薬理

分枝形態形成は器官形成過程において重要な現象であり、胎生期における上皮・間葉相互作用やそれらの関連因子によって制御されている。一方、ヘッジホッグファミリーである Shh は器官発生の際に働く重要なモルフォゲンとして唾液腺、膵臓、腎臓などの多くの発生現象に関与していることが知られている。これまでに、我々は顎下腺原基に Shh を作用させることで、EGF の発現を増加させ、分枝形態形成を促進させることを報告してきた。本研究では Shh が誘導する分枝形態形成と EGF/ErbB シグナルの関係を明らかにするため、器官培養、リアルタイム RT-PCR、イムノブロット解析を用いて詳細に検討を行った。その結果 Shh は 1,000 ng/ml 以上の濃度で分枝形態形成を促進した。Shh 処理後 6 時間で *Egf*、12-24 時間で *Nrg1* の mRNA 発現が有意に上昇した。処理後 3 時間から *ErbB1*、*ErbB2* および *ErbB3* の mRNA の有意な増加が確認された。Shh 処理後 6 時間から ErbB1 のリン酸化の上昇と ErbB1 のタンパク質量の増加が見られた。ERK1/2 のリン酸化状態については Shh 処理後 6 時間と 48 時間の 2 つにピークが認められ、二相性の変化を示した。AG1478 を前処理した場合、ErbB1 と ERK1/2 のリン酸化状態に変化は認められなかった。さらに、Shh 刺激により、*Egf* は間葉で、*ErbB1*、*ErbB2* および *ErbB3* の mRNA 発現は上皮で特異的に上昇することが確認された。分離上皮に対し直接 Shh を作用させてもクレフト形成は認められなかった。また、Shh シグナルの転写因子である *Gli1* の mRNA の発現量が Shh 刺激後 3h 以降有意に上昇していた。以上の結果から、Shh は *Gli1* の発現を上昇させ、間葉における EGF ligand の発現上昇と上皮での ErbB 量の増加により EGF/EGFR (ErbB) シグナルの活性化を介して分枝形態形成を促進させていることが明らかになった。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

EGF/ErbB/ERK1/2 signaling regulates branching morphogenesis of submandibular-land rudiment through activation of Shh/Ptch/Gli signaling system

○Mizukoshi K, Koyama N, Kashimata M

Dept Dent Pharmacol, Asahi Univ Sch Dent

Sonic hedgehog which are well known as morphogens that play many important roles during development of numerous organs including salivary glands (SMG). In this study, we investigated the relationship between Shh and epidermal growth factor (EGF) signalings in developing fetal mouse SMG. Materials and Methods: E13 SMGs were cultured on DMEM/F12 medium with or without Shh. After culture, the numbers of endpieces per rudiment were counted, and the cultured SMG used as samples of real time RT-PCR and of Western blotting analysis. In some experiments, the mesenchyme-free epithelial culture system was used for morphological study and for as samples for real time RT-PCR. Results and Discussion: Shh stimulated branching morphogenesis (BrM), and induced expressions of mRNAs for EGF and ErbB family, resulting activation of ERK1/2. AG1478, ErbB inhibitor, completely suppressed BrM and activation of EGF/ErbB/ERK1/2 cascade with Shh. The expressions of mRNA for *Egf* in mesenchyme and mRNA for *ErbB1*, *ErbB2* and *ErbB3* in epithelium were specifically induced by Shh. The level of *Gli1* transcription factor was drastically elevated by Shh. These results show that Shh/Ptch/Gli signaling regulates BrM of fetal mouse SMG through activation of EGF/ErbB/ERK1/2 signaling system.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-25 Cdc42-PAK 経路を介した管腔臓器の維持

○設楽 彰子

米国立衛生研

管腔臓器が適切な管腔の大きさ、形態をもつことは臓器が正常な機能を維持する上で重要である。本研究で我々は、Cre 発現アデノウイルスを用いて Cdc42 (floxed/floxed) マウスの顎下腺の Rho GTPase Cdc42 をノックアウト (KO) し、Cdc42 を介した管腔上皮の維持機構を調べた。唾液腺の Intercellular canaliculi (IC) は腺房細胞間に形成される管腔構造であり最終的に主導管へと繋がる。顎下腺で Cdc42 を KO すると IC が拡張した。免疫染色により拡張した IC 上に腺腔側膜と基底側膜のタンパク質が両方観察されたことから、Cdc42 KO による細胞極性の変化が示唆された。そこで腺腔側膜と基底側膜を隔てるタイトジャンクション (TJ) の局在を調べたところ、通常 IC 周囲に観察される TJ タンパク質が Cdc42 KO 細胞では認められなかった。さらに極性タンパク質である Par6 も Cdc42 KO 細胞で観察されなかったことから、Cdc42 は TJ 及び細胞極性の制御を介して管腔形態を維持することが示された。siRNA を用いたスクリーニング解析から Cdc42 はそのエフェクターである PAK4 と Par6B を介して TJ 形成を制御するとされている。PAK 活性を阻害剤の腹腔内注射により抑制したところ IC 拡張がみられたことから、Cdc42 は PAK を介して管腔構造を維持することが示唆された。最後に我々は顎下腺と同様の遺伝学的、薬理学的手法を肝臓に応用し Cdc42-PAK を介する管腔構造維持機構が一般的なものであるかを調べた。その結果 Cdc42 の KO および PAK 阻害剤により胆細管が拡張することが示された。本研究から我々は Cdc42-PAK 経路は管腔臓器の恒常性の維持において重要な役割を果たすことを明らかにした。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Cdc42-PAK pathway contributes to maintain tubular organs

○Shitara A

LCMB, CCR, NCI, NIH

Maintaining proper lumen size and shape in tubular organs is fundamental for organ function. In this study, we used conditional knockout strategy that specifically deplete Cdc42 in submandibular gland (SMG), and revealed the Cdc42-related pathways in maintaining epithelial tubules. Intercellular canaliculi (IC) is the distal luminal structure of SMG that is located between two or three acinar cells. Cdc42 depletion in SMG induced the expansion of IC. Immunofluorescent analysis revealed the mixing of the apical and the basolateral membrane proteins on the expanded IC. Tight junction (TJ) protein, which segregate apical and basolateral plasma membrane, is absent in Cdc42 deficient cells. In addition, polarity protein Par6, which is normally observed on the IC, also absent from IC in Cdc42 deficient SMG. These results indicate that Cdc42 play important roles in maintenance of TJ and polarity in SMG cells. The siRNA based screening experiment has reported that Cdc42 regulates TJ formation through its effector PAK4 and Par6B. We pharmacologically inhibited PAK activity by injection of PF-3758309, and revealed that PAK inhibition led to expansion of IC. Our findings demonstrate that Cdc42-PAK pathway contributes to maintain epithelial tubules, offering important molecular insights into organ homeostasis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-26 マウス顎下腺の顆粒性導管に存在するピラー細胞の機能的解析

○野中 直子, 中村 雅典

昭大 歯 口腔解剖

【目的】齧歯類顎下腺に介在部と線条部の間には特有な顆粒性導管がある。我々はこれまでに、マウス顎下腺顆粒性導管内に存在するピラー細胞が下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) のレセプター (PAC1R) を発現していることを明らかにしてきたが、唾液分泌への関与については不明である。そこで、PACAP 投与による唾液分泌量と性状への影響について解析した。【材料と方法】8 週齢雄性 C57BL/6 マウスを用いた。PACAP38 を含む生理食塩水 2 μ l を両側鼻腔に投与し、経時的に唾液分泌量を測定した。PACAP の唾液腺への直接的作用の検討のため、PACAP 投与前にアトロピンを投与した。PAC1R 局在は、耳下腺・顎下腺・舌下腺を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定後、凍結切片を作成し、抗 PAC1R 抗体で免疫組織学的に検索した。唾液中の EGF 量の測定は ELISA 法で行った。【結果】PACAP 投与 1 時間で対照群に比して有意な唾液分泌量の亢進を認め、その上昇は約 1.5 倍であった。この分泌亢進はアトロピン投与では抑制されないため、PACAP による唾液分泌亢進は唾液腺への直接的作用であることが示された。顎下腺では、PAC1R 局在は顆粒性導管にあるピラー細胞に発現していた。一方、耳下腺と舌下腺の PAC1R 局在は、主に線条部導管に発現を認めた。PACAP 投与後の唾液中 EGF 濃度は対照群に比して約 2 倍の有意な上昇を示した。【考察】PACAP 経鼻投与で有意な唾液分泌亢進が認められた。耳下腺・舌下腺における PAC1R 局在は主に線条部導管であることから、PACAP による唾液分泌亢進は腺房からの唾液分泌促進ではなく、再吸収の抑制によるものと考えられる。また、唾液中の EGF 量の上昇ならびにピラー細胞での PAC1R 発現は、ピラー細胞が顆粒性導管細胞からの EGF 等の成長因子の分泌促進に関与していることが示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The functional analysis of the pillar cells in granular ducts of mouse submandibular glands

○Nonaka N, Nakamura M

Dept Oral Anat Dev Biol, Showa Univ Sch Dent

The control of saliva secretion is mainly under the autonomic nervous control. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is now recognized as the multi-functional neuropeptide in various organs. In this study, we examined the effect of PACAP on saliva secretion and also detected the distribution of PACAP type 1 receptor (PAC1R) in major salivary glands; parotid, submandibular and sublingual glands, of 8 weeks-old male C57BL/6 mice. Intranasal administration of PACAP 38 increased the amount of secreted saliva and this induction was not inhibited by atropine pretreatment. Immunohistochemical study showed the distribution of PAC1R in three major salivary glands. In parotid gland, PAC1R was detected in the cells of striated duct. In the case of submandibular gland, the strong immunoreaction of PAC1R was detected in the tall columnar epithelial cells in granular ducts, called pillar cells, and some of the cells in the striated ducts. In sublingual gland, PAC1R was expressed mainly in the epithelial cells of striated ducts. These results suggested that PACAP might directly regulate saliva secretion by controlling the absorption activity in the duct and also that pillar cells might regulate function of granular epithelial cells in the granular duct, such as the secretion of growth factors into saliva.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-27 唾液腺再生過程で見られる雌雄差について

○赤松 徹也^{1,2}, 姚 陳娟¹, 長谷川敬展¹, 吉村 弘¹

¹徳大 院医歯薬 口腔分子生理

²徳大 院生物資源産業 生体分子機能

【目的】唾液腺の主導管結紮-再開放系は、唾液腺再生モデルとして知られるが、その分子機構は未解明である。我々はこれまでに、本再生過程にサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素(SPC)のPACE4が関与することや雌雄差があること等を報告した。今回、雌雄差の影響について、卵巣摘出雌性ラットを用い検討した。

【方法】7週齢雌雄のSDラットを深麻酔下、右側顎下腺主導管を結紮(L)し、左側は非結紮対照(CL)とした。卵巣摘出雌性ラットは5週齢時に卵巣摘出(ox)し、7週齢時に主導管結紮術を行った。結紮3,5週間後(L3, L5)、および結紮1週間後に再開放し、更に2,4週間後(L1O2, L1O4)に各々顎下腺を摘出、解析した。

【結果・考察】雌雄共に対照群(CL)の変化はなく、結紮群(L3, L5)では顎下腺の萎縮、腺重量の減少を確認した。この変化は再開放群(L1O2, L1O4)も同様であったが、L1O4はL1O2より、また、♀は♂より優位に腺重量の回復が認められた。一方、卵巣摘出群(oxL1O2, oxL1O4)の腺重量の変化は♀より♂に近い傾向にあった。各顎下腺でのPACE4およびAQP5の発現をWestern blotにより解析したところ、結紮側でのみ発現の誘導/変動が認められ、♂では両者の発現レベルに逆相関関係が示唆されたが、♀では認められなかった。卵巣摘出群では♂同様の逆相関関係が示唆され、唾液腺再生過程で見られる雌雄差は性ホルモン、特に雌性ホルモンの影響が考えられた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Sexual difference in regeneration of salivary gland

○Akamatsu T^{1,2}, Yao C¹, Hasegawa T¹, Yoshimura H¹

¹Dept Mol Oral Physiol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

²Field Biomol Func & Technol, Tokushima Univ Grad Sch Biosci & Bioind

Ligation and re-opening of the main excrete duct of submandibular gland is known as regeneration model of salivary gland. We previously reported the involvement of a subtilisin-like proprotein convertase, PACE4 and the sexual difference in this regeneration process. Here, we analyzed the sexual difference of salivary regeneration by using female rat with ovariectomy.

No change was observed in the contralateral glands of each rat, while the atrophy and weight decrease of ligated gland (L3, L5) were confirmed. These changes were also observed in the re-opening group (L1O2, L1O4), but the recovery of gland weight was significantly observed in L1O4 rats than L1O2 rats, and female than male. That of female rats with ovariectomy seemed to be like male rats. By Western blotting, the induction and changes of expression of PACE4 and AQP5 were observed in the ligated glands, but not in the contralateral glands. In male rats, inverse correlation of the expression level of PACE4 and AQP5 was observed, but not in female rats. Interestingly, inverse correlation of the expression level of PACE4 and AQP5 was also observed in female rats with ovariectomy, suggesting the involvement of sex hormone, especially estrogen, in sexual difference of the salivary gland regeneration.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-28 傷害側唾液腺と非傷害側唾液腺における相互作用

○横山 愛, 加藤 治, 吉垣 純子

日大松戸歯 生理

【目的】頭頸部癌の治療のための放射線照射により唾液腺がダメージを受けると、唾液分泌量は低下する。しかし、照射範囲が片側である場合には、非照射側の唾液腺が唾液分泌機能を補うという報告がある。大唾液腺は左右で対に存在し、それぞれが独立した臓器である。それにも関わらず、傷害側の機能を補うということは傷害側と非傷害側の唾液腺間でなんらかのコミュニケーションがあることが予測される。本研究の目的は、唾液腺間の代償作用における情報伝達メカニズムの解明である。我々はまず、傷害側と非傷害側の唾液腺間に相互作用が存在するのかを検討するために、片側唾液腺傷害時における非傷害側の唾液腺の変化について検討した。【方法】マウス片側耳下腺排泄導管をマイクロクリップにて結紮した。その後4, 7日目に両側の耳下腺を摘出し重量を測定した後、浸漬固定を施行した。全てのサンプルにHE染色と抗Ki67抗体における免疫組織化学染色を行った。コントロールとして、疑似手術マウスの非傷害側の唾液腺を使用した。【結果】重量はコントロールの唾液腺が最も重く、続いて非傷害側、傷害側は最も軽かった。形態学的な変化として、傷害側唾液腺では腺房細胞が萎縮し、炎症性細胞の増加が観察された。非結紮側とコントロールでは、形態学的な変化は認められなかった。抗Ki67染色では、陽性細胞数がコントロール、非傷害側、傷害側の唾液腺の順で多くなったのが観察された。【結論】非傷害側の唾液腺をコントロールと比較すると変化が認められたことから、片側の唾液腺が傷害を受けると非傷害側の唾液腺へなんらかの情報伝達があることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Interaction between injury side and non-injury side in salivary gland

○Yokoyama M, Katsumata-Kato O, Fujita-Yoshigaki J

Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

The injury of salivary gland such as radiation treatment of head and neck cancer cases decline in ability to salivate. There are some reports that when one side of salivary gland receives injury, the other side of gland compensates for its function. But the mechanism is unclear. In this study, for the purpose of analysis on compensatory mechanism, we examined the interaction between injured side and non-injured side of salivary gland. We carried out unilateral mouse parotid main excretory duct ligation. We examined the weight variation, morphological change and proliferation potential. The heaviest was sham, followed in order by non-ligation side and ligation side of parotid. Morphologically, the atrophy of acinar cells was observed in the ligation side. To examine proliferation potential by using Ki67 proliferation-associated antigen, the number of Ki67 positive cells was increased in order of sham, non-ligation side and ligation side. These results suggested that there are some kinds of signaling pathways to the opposite side from the injured side.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-29 唾液腺マイクロRNAの発現調節：更年期後のストレスのバイオマーカーとしての可能性

○栗原 琴二, 村本 和世

明海大 歯 生理

【目的】マイクロRNA (miRNA)は22塩基程度の単鎖RNAで血液や唾液に分泌される。唾液腺のmiRNAのストレスマーカーとしての可能性を検討した。

【方法】動物はICR系マウスを用いた。miRNAの定量はmiRNAの3'側にリンカーを修飾し、逆転写反応後、目的miRNAとリンカー間で増幅するリアルタイムPCRで測定した。

【結果と考察】

- ・マウス顎下腺に存在するmiRNAのクローニングを行った結果、42種が発現していた。
- ・雌雄差を比較すると、雄にmiR-141,miR-143,miR-21aが顕著に存在していた。正常の雄マウスに薬理学濃度のジヒドロテストステロン(DHT)を投与しても、これら3者に顕著な増加は認められなかった。内因性のアンドロゲンが十分存在する場合、投与されたDHTの効果は内分泌のフィードバック機構によって現れないと考えられる。
- ・デュタステリドはテストステロンをDHTに変換する5 α 還元酵素を阻害する薬剤で、男性型脱毛症(AGA)や前立腺肥大の治療薬である。内因性のDHTを減少させる目的でデュタステリドを投与すると、miR-143は減少したが、miR-141,miR-21aに顕著な効果は認められなかった。内因性のテストステロンが十分な場合、miR-141,miR-21aは大きな影響を受けないと考えられる。
- ・睪丸切除を行うと、miR-141,miR-143,miR-21aが同時に減少した。これはLOH症候群やPADAMと言われるテストステロンレベルが極端に下がった男性更年期の状態と考えられる。睪丸切除したマウスにDHTを投与すると、miR-143の回復は認められなかったが、miR-141とmiR-21aは顕著に増加し、雄様への回復が認められた。後の2者はDHT依存性に変動すると考えられる。
- ・ストレス時に糖質コルチコイドが増加することは周知である。睪丸と副腎を切除したマウスにデキサメタゾン投与すると、DHTと同様の結果が得られた。

【結論】miR-141,miR-143,miR-21aの変動パターンは、更年期後のストレスのバイオマーカーとなる可能性がある。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Regulation of microRNAs in mouse salivary glands: a putative Bio-Marker of stress-dependent diseases under partial androgen deficiency in aging males (PADAM)

○Kurihara K, Muramoto K

Div Physiol, Meikai Univ Sch Dent

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of 18–28 nucleotides that play key roles in the regulation of gene expression. We examined effects of stress-dependent diseases on the expression pattern of miRNAs in mouse submandibular glands (SMGs) *via* androgen receptor. SMGs of ICR mice were investigated for miRNAs and 42 miRNAs were identified. Expression patterns of these miRNAs in mice with various hormonal treatments were analyzed by quantitative real-time PCR. Among of the 42 miRNAs, miR-21a and miR-143 were much abundant and miR-141 slightly abundant in male mouse SMGs. On the other hand, dihydrotestosterone (DHT) administration to normal males increased the miR-21a, miR-141 and miR-143 expression with almost the same ratio. Castration caused remarkable decrease in the expression of these three miRNAs, this condition is expressive of PADAM. DHT administration to the castrated mice greatly increased miR-21a and miR-141 but slightly miR-143. It is well known that the glucocorticoid is secreted under stress-dependent diseases. Effect of dexamethasone-administration to adrenalectomized mice combined with castration was similar effect of DHT on castrated mice. In conclusion, the change in expression patterns of miR-21a, miR-141 and miR-143 was expected to apply for diagnosis of stress-dependent diseases under PADAM.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-30 ピロカルピンの前投与による唾液分泌亢進と遺伝子発現変化

○森田 貴雄, 根津 顕弘, 谷村 明彦

北医療大 歯 薬理

【目的】ムスカリン受容体アゴニストのピロカルピン(Pilo)は、シェーグレン症候群の治療薬として使われている。Piloは唾液腺のムスカリン受容体を介して分泌を起こすと考えられるが、加えて中枢神経を介する作用も考えられている。またPiloの継続投与による唾液分泌量の漸次的増加が報告されている。これには唾液腺腺房細胞や中枢神経における何らかの感受性亢進が考えられ、遺伝子発現の変化を伴うと予想される。本研究では、Piloの前投与による唾液分泌亢進とそれに伴う遺伝子発現変化を検討した。【方法】麻酔下のラットにPilo(1 mg/kg)を腹腔内投与し、30分間に口腔内に分泌された唾液を綿球で採取し、唾液分泌量を算定した。ラット顎下腺からの分泌速度をリアルタイムで測定した。ラットの顎下腺及び脳組織から抽出したtotal RNAを用いて遺伝子発現の網羅的解析を行い、その結果をRT-PCRで確認した。【結果と考察】9週齢のラットにPiloを投与し、その一週間後(10週齢)にPilo投与による唾液分泌量を測定すると、コントロールの非前投与群と比較してPilo前投与群の分泌量が増加していた。またリアルタイム測定により、低濃度のアセチルコリン感受性も亢進していた。次世代シーケンシングによるmRNA発現の網羅的解析の結果、検出された10668遺伝子中、Pilo前投与群の顎下腺では非投与群に比べ、約120遺伝子で2倍以上の増減が見られ、脳でも50遺伝子で2倍以上の増減が示された。このうち細胞増殖に関与するいくつかの遺伝子で、RT-PCRにより網羅的解析と同様の結果が得られた。この結果から、piloの前投与による唾液腺腺房細胞での感受性亢進、さらに中枢での神経伝達の増強などが考えられた。【結論】Piloの前投与によって唾液分泌が亢進し、顎下腺のみならず脳組織の遺伝子発現が変化することが明らかになった。今後はCa²⁺シグナルや亢進のタイムコースなどを検討し、唾液分泌亢進の分子メカニズムを解明する。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Enhancement of salivary secretions and changes of gene expression by previous administration of pilocarpine

○Morita T, Nezu A, Tanimura A

Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Pilocarpine (pilo), which is known to be a therapeutic drug of Sjogren syndrome, causes the increases in saliva secretion gradually by continuous administration. This result implies that the increase in saliva secretion is due to up-regulation of some sensitivity in salivary gland and/or central nervous system. We examined the effects of preadministration of pilo in saliva secretion and gene expression. Preadministration of pilo increased in the amount of saliva induced by pilo compared to control untreated rat. Real-time analyses of rate of secretion from submandibular gland showed that preadministration resulted in enhancement of sensitivity of acetylcholine. Comprehensive analyses of gene expression in rat submandibular gland and brain were performed. As the results, in pilo-preadministrated rat, about 120 genes in submandibular gland and 60 genes in brain were up-regulated or down-regulated remarkably (> 2 fold) compared to control rat. RT-PCR analyses confirmed that several genes related to cell proliferation were up-regulated in submandibular gland or brain in pilo-preadministrated rats. These results showed that preadministration of pilo increased in salivary secretion by enhancement of some sensitivity in submandibular gland and brain such as the changes of gene expression.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-31 液状飼料飼育が成長期ラット顎下腺・舌下腺の腺房細胞に与える影響について

○高橋 茂¹, 上北 広樹², 谷脇 裕人¹, 井上貴一郎¹, 土門 卓文¹

¹北大 院歯 口腔機能解剖

²北大 院歯 冠橋義歯補綴

【目的】 演者らは成長期ラットを液状飼料で飼育すると耳下腺の成長が阻害されることを報告してきた。今回さらに顎下腺・舌下腺の成長，特に腺房細胞にはどのような影響が及ぶのかについて組織学的，免疫組織化学的に検討した。【方法】 Wistar 系雄性ラットを3週齢で離乳し，直後より対照群の動物には通常の固形飼料，実験群には粉末飼料に水を加えて作製した液状飼料を0～8週間与えた。実験期間が終了した動物には5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を投与し，1時間後に顎下腺と舌下腺を摘出，湿重量を測定した。通法に従って試料を組織学的に検索するとともに，腺房細胞の増殖活性検討のために抗 BrdU 抗体，アポトーシス検討のために抗 cleaved caspase 3 (Casp-3)抗体を用いた免疫染色を行った。【結果と考察】 顎下腺では湿重量は対照群，実験群ともに実験期間中増加傾向を示し，両群間に有意差は認められなかった。組織学的には対照群では0週の腺房細胞は小型であったが経時的にその大きさが増加し，実験群の腺房細胞もほぼ同様の変化を示していた。腺房細胞の BrdU 陽性率は両群ともに経時的に減少し，各期間における有意差は認められなかった。Casp-3 陽性腺房細胞はいずれの標本においてもほとんど観察されなかった。舌下腺では各計測値に関して4週まで対照群と実験群の間に差異は認められなかったが，腺房細胞の大きさと BrdU 陽性率は8週では実験群の方が対照群よりも有意に低かった。Casp-3 陽性腺房細胞は顎下腺同様いずれの標本においてもほとんど認められなかった。以上の結果より，成長期における液状飼料飼育は顎下腺に対しては影響を与えず，舌下腺に対しても極めて軽度な影響しか及ぼさないことが明らかとなった。このことは成長が大きく阻害される耳下腺とは異なると考えられた。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effects of liquid diet on acinar cells in submandibular and sublingual glands of growing rats

○Takahashi S¹, Uekita H², Taniwaki H¹, Inoue K¹, Domon T¹

¹Dept Oral Functional Anat, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

²Dept Crown Bridge Prosthodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

This study is designed to clarify how liquid diet affects acinar cells in submandibular and sublingual glands of growing rats. Male Wistar rats were weaned on day 21 after birth and fed a pellet diet for control group or a liquid diet for experimental group from 0 to 8 weeks. Then submandibular and sublingual glands were taken, weighed, and examined histologically and immunohistochemically using antibodies to 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and cleaved caspase 3 (Casp-3). In submandibular glands, there were no significant differences in wet weight, acinar cell area, and BrdU-labeling index of acinar cells between control and experimental groups at all time points. Casp-3-positive acinar cells were scarcely identified in all specimens. In sublingual glands, there were no significant differences in each data between two groups until 4 weeks, however acinar cell area and BrdU-labeling index of acinar cells in experimental group were significantly lower than those in control at 8 weeks. Casp-3-positive acinar cells were hardly observed in both groups at each time point. These data showed that liquid diet had no or slight effects on acinar cells in submandibular and sublingual glands of growing rats.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-32 うま味刺激により誘導される小唾液腺唾液分泌の日内変動

○古山 昭, 大須賀謙二, 川合 宏仁

奥羽大 歯 口腔機能分子生物

小唾液腺からの唾液分泌量は総唾液量の8%に過ぎないが、小唾液腺は口腔内に広く分布し、ムチンの含有率が高く、口腔粘膜の保護や嚥下の円滑化に重要な役割を果たすと考えられる。近年ではうま味刺激による小唾液腺唾液分泌促進が、ドライマウス改善に効果的との報告もあり、小唾液腺唾液分泌量を変化させる因子の究明は興味深い課題である。安静時における総唾液分泌量は日内変動し、ストレスや喫煙などにより分泌量が変動するなどの報告はあるが、味覚刺激誘導性の小唾液腺唾液分泌を変動させる因子については十分に研究されていない。そこで本研究では、安静時および味覚刺激により誘導される小唾液腺唾液分泌をヨウ素-デンプン反応を応用した方法で測定し、日内変動の有無を検討した。その結果、安静時の唾液分泌量は午前($0.85 \pm 0.44 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{min}$, mean \pm SD, $n=12$)において午後($0.45 \pm 0.24 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{min}$, $n=9$)よりも有意に多かった($p < 0.05$, Mann-Whitney U test)。さらに、うま味刺激によって誘導される口唇腺唾液分泌量も午前の方が午後よりも多かったが、興味深いことに、味刺激後の唾液分泌時系列も顕著に異なっていた。午前中(10時~11時)では刺激2分後の唾液分泌量は安静時唾液量の約1.6倍であるが、刺激後徐々に唾液分泌量が増加し、刺激後14分では安静時唾液量の約2.6倍に達し、その後緩やかに減少した。また、午後(14時~17時)では、刺激2分後の唾液分泌量が安静時の約2.2倍と顕著な増大する一方で、刺激8分後には安静時の約1.2倍と急速な唾液分泌量の低下が見られた。小唾液腺からのうま味誘導性唾液分泌の日内変動が交感神経活動と関連するかどうかを検証するために、うま味誘導性小唾液腺唾液分泌量変化と唾液アミラーゼ量の変化に相関があるかどうかを調べ、合わせて報告する。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。**The daily variation of umami-induced salivation in minor salivary glands**

○Furuyama A, Ohsuga K, Kawai H

Div Oral Func Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent

To investigate the daily variation of flow rates and the time course of taste-stimuli induced salivation in the minor salivary glands, we measured the amount of secreted saliva from lower labial glands using the iodine-starch reaction method. Not only the flow rate of resting saliva in the morning ($0.85 \pm 0.44 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{min}$, mean \pm SD, $n=12$) was significantly larger ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test) than that in the afternoon ($0.45 \pm 0.24 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{min}$, $n=9$), the flow rate of umami-induced salivation in the morning was also larger than that in the afternoon. Interestingly, the time course of umami-induced salivation in the morning differed from that in the afternoon. The flow rate of umami-induced salivation two minutes after the stimulus was about 1.6 times larger than the flow rate of resting saliva, and it was increased with time. Fourteen minutes after the stimulus, it reached about 2.6 times of resting saliva, and then declined moderately. In the afternoon, on the other hand, the flow rate two minutes after the stimulus was about 2.2 times larger than the flow rate of resting saliva, but eight minutes after stimulus, it was decreased rapidly to 1.2 times of resting saliva.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-33 SNARE ノックアウト HAP1 細胞における遺伝子発現解析—SNAP23, Syntaxin4, Syntaxin2 KO の比較

○荒川 俊哉¹, Nattakarn Hosiriluck^{1,2}, 岡山 三紀², 溝口 到², 田隈 泰信¹

¹北医療大 歯 生化

²北医療大 歯 矯正

【目的】SNARE タンパク質は、開口分泌や細胞内膜輸送で重要な役割を担っている。ノックアウト (KO) マウスにおいて、SNAP23 と Syntaxin4 は共に胎生 3.5 日および 7.5 日で死滅するが、Syntaxin2 は胎生致死とはならない。本研究では、この差に着目し、これら 3 つの t-SNARE タンパク質が、どのような遺伝子発現と関連しているのか、SNAP23, Syntaxin4 および Syntaxin2 を KO した HAP-1 細胞を用いて検討した。【方法】ゲノム編集ツールの CRISPR/Cas9 を用いて SNAP23, Syntaxin4 および Syntaxin2 の KO 細胞を作成した。DNA マイクロアレイにより遺伝子発現の違いを網羅的に解析した。定量 PCR によって発現の再検討を行った。【結果】DNA マイクロアレイ解析の結果、SNAP23, Syntaxin4 および Syntaxin2 の KO 細胞に共通して発現低下の見られた遺伝子に、TCEAL8 (転写調節因子; それぞれ 0.0035 倍, 0.0028 倍, 0.0025 倍), SYK (細胞増殖分化関連因子; 0.0056 倍, 0.31 倍, 0.0029 倍), BMP2 (骨増殖分化因子; 0.012 倍, 0.0095 倍, 0.0086 倍), FOXA2 (ホメオティック遺伝子; 0.012 倍, 0.0092 倍, 0.0088 倍) などがあった。他方、SNAP23 KO および Syntaxin4 KO では低下するが、Syntaxin2 KO ではむしろ発現が増加する遺伝子に、FOXF1 (ホメオティック遺伝子; 0.11 倍, 0.069 倍, 1.22 倍) と BMP7 (骨増殖分化因子; 0.18 倍, 0.011 倍, 16.99 倍) があった。【結論】3 種類の KO 細胞で発現の変化が共通する遺伝子と共通しないものが明らかとなり、発生・分化や致死性との関連が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Analyses of gene expression in SNARE-gene knockout HAP1 cells

○Arakawa T¹, Hosiriluck N^{1,2}, Okayama M², Mizoguchi I², Takuma T¹

¹Div Biochem, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

²Div Orthod Dentofac Orthop, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Objective: SNAP23 and Syntaxin4 knockout (KO) mice were reported to cease their development at 3.5 or 7.5 embryonic days, respectively, but syntaxin2 KO mouse was survive. Although SNARE proteins are widely recognized to play a critical role in exocytosis and subcellular membrane trafficking, their role in embryonic development is scarcely understood. Thus, we prepared SNARE-KO HAP1 cells and compared the gene expression among these cells. **Methods:** Either one of SNAREs, SNAP23, syntaxin4, or syntaxin2, was knocked down by CRISPR/Cas9 genome editing. The gene expressions were comprehensively analyzed by DNA microarray. **Results:** From DNA microarray data genes were classified into 2 types; the type 1 genes, whose expressions were markedly decreased in all 3 KO cells, included TCEAL8 (a gene encodes the transcription elongation factor), SYK (a tyrosine kinase), BMP2 (bone morphogenetic protein 2), and FOXA2 (a forkhead family of transcription factor). The other type of genes, whose expressions were similarly decreased in SNAP23- and syntaxin4-KO cells but rather increased in syntaxin2 KO cells, involved FOXF1 (a forkhead family of transcription factor) and BMP7 (bone morphogenetic protein 7). **Conclusion:** These results suggest that SNAP23, syntaxin4, and syntaxin2 have different role in embryonic development and differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-34 フラクトオリゴ糖がラット唾液 IgA 分泌速度の継時的変化に与える影響

○山本 裕子¹, 東 雅啓², 猿田 樹理², 槻木 恵一²

¹神歯大 短大 歯科衛生

²神歯大 院歯 口腔科学

【目的】唾液中には IgA が含まれており、上気道感染症の感染防止に関与していることが報告されている。我々はこれまでに、フラクトオリゴ糖 (FOS) 摂取が唾液中 IgA 分泌速度を上昇させることを明らかにした。本研究では、唾液中 IgA 分泌速度を上昇させる機序をベイジアンネットワークによる因果関係の解析から明らかにすることを目的とした。【方法】AIN76 のコーンスターチ 15.0% とセルロース 5.0% をグラニュー糖に置き換えた無繊維固形飼料を対照飼料とし、5.0% FOS 添加飼料を調整した。5 週齢 Wistar 系雄ラットを 2 群 (各群 n=6) に分け、予備飼育後に各飼料を自由摂取させた。0, 1, 4, 8 週後に盲腸組織、盲腸内容物、顎下腺、唾液を採取した。盲腸内容物および唾液中 IgA 濃度は ELISA 法にて測定した。盲腸内容物は各週の pH と 8 週後の有機酸濃度を測定した。【結果】二元配置分散分析の結果、顎下腺重量あたりの唾液中 IgA 分泌速度は FOS 添加と摂取期間の間に交互作用が認められ ($p < 0.05$)、1 および 8 週後で対照区よりも FOS 区の方が高い値が認められた ($p < 0.05$, Tukey 多重比較)。ベイジアンネットワークによる因果関係の解析によって、唾液中 IgA 分泌速度上昇の原因が、盲腸内容物中短鎖脂肪酸濃度、盲腸内容物重量、FOS 添加であることが示された。しかしながら、唾液中 IgA 分泌速度上昇に盲腸内容物中 IgA 濃度が直接関与していないことが示された。【結論】唾液中 IgA 分泌速度は、FOS 添加 1 週後に上昇しその増加は 8 週後まで持続することが示された。唾液中 IgA 分泌速度上昇の原因は、盲腸内容物中短鎖脂肪酸濃度、盲腸内容物重量、FOS 添加であることが示された。唾液中 IgA 分泌速度上昇の原因は FOS 添加による盲腸内発酵に関わる因子であり、唾液中 IgA 増加に盲腸内容物中短鎖脂肪酸が関与していることが示唆された。FOS のような難消化性糖類の継続的摂取が大腸での短鎖脂肪酸濃度を上昇させ、唾液中 IgA 分泌速度も上昇させる可能性がある。【利益相反】利益相反状態にはありません。

The salivary IgA flow rate is increased by high concentrations of short-chain fatty acids in the cecum of rats ingesting fructooligosaccharide

○Yamamoto Y¹, To M², Saruta J², Tsukinoki K²

¹Dept Dent Hygiene, Kanagawa Dent Univ Jr College Div

²Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

Salivary IgA serves as a major effector in mucosal immunity by preventing submucosal invasion of pathogens. This study investigated the effects of fructooligosaccharide (FOS) intake and time after feeding on IgA levels in the saliva and cecal digesta and on the concentration of short-chain fatty acids (SCFA) in the cecum in rats. Five-week-old rats were randomly divided into eight groups to receive a fiber-free diet or a diet with 50 g/kg FOS for 0, 1, 4, and 8 weeks. The salivary IgA level, concentration of IgA in the cecal digesta, and concentration of SCFA in the cecal digesta were assessed. Ingestion of FOS at 1 and 8 weeks led to a higher IgA flow rate of saliva per weight of submandibular gland tissue ($p < 0.05$). The Bayesian network analysis showed that salivary IgA was directly affected by the concentration of SCFA in the cecal digesta but had no direct relationship with the IgA concentrations in the cecal digesta. Ingestion of FOS increased salivary IgA secretion through high levels of SCFA in the large intestine. Thus, continuously ingesting fermentable fibers such as FOS to increase SCFA in large intestine for more than 1 week could increase secretion of salivary IgA.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-35 唾液ヒスタチンとペプチドグリカンの結合による Toll 様受容体 2 シグナルへの影響

○今村 泰弘¹, 王 宝禮², 十川 紀夫¹

¹松歯大 歯科薬理

²大歯大 細菌

【目的】ヒスタチンは歯周病原菌に対して抗菌作用を有する唾液タンパク質である。これまでに我々は、ヒスタチンが菌体成分ペプチドグリカン (PGN) による Toll 様受容体 2 (TLR2) のシグナル伝達を抑制することについて示した。また、PGN 刺激によるヒト歯肉繊維芽細胞 (HGFs) の炎症性サイトカイン産生は、ヒスタチンによって抑制されることも示した。これらの結果は PGN がヒスタチンに直接結合している可能性がある。従って、本研究ではこの結合性について検討した。【方法】ヒスタチン 3 とコントロールペプチドをそれぞれプレートにコーティングし、*S. aureus* 由来 PGN 或いはコントロールとしてヒスタチン 3 と結合する熱ショックタンパク質 HSC70 を添加した。その後、抗 *S. aureus* 抗体 (PGN を認識) 或いは抗 HSC70 抗体を用いて PGN とヒスタチン 3, HSC70 とヒスタチン 3 の結合を解析した。【結果】PGN はヒスタチン 3 と直接結合することが明らかとなった。また、これまでに示した HSC70 とヒスタチン 3 との結合もこの実験系で認められた。【考察】以前に我々は、ヒスタチン 3 が HSC70 刺激による TLR2, TLR4 のシグナル伝達 (特に NF- κ B) と HGFs の炎症性サイトカイン産生を抑制することについて示した。これらの結果と同様に、PGN がヒスタチン 3 と直接結合することにより、PGN による TLR2 シグナル伝達活性化の抑制が認められた。従って、ヒスタチン 3 は口腔内で菌体成分由来 PGN によって誘導される炎症を抑制すると考えられる。また、ヒスタチンは抗菌作用と抗炎症作用をもつ自然免疫因子であると考えられる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of peptidoglycan binding to salivary histatin on Toll-like receptor 2 signaling

○Imamura Y¹, Wang PL², Sogawa N¹

¹Dept Dent Pharmacol, Matsumoto Dent Univ

²Dept Bacteriol, Osaka Dent Univ

Purpose: Histatins are salivary proteins, which have antimicrobial activities against periodontal pathogens. We have previously shown that histatin 3 inhibits peptidoglycan (PGN)-mediated Toll-like receptor (TLR) 2 signaling and the production of inflammatory cytokines by PGN in human gingival fibroblasts (HGFs). It is possible that PGN binds directly to histatin 3. Therefore, we examined this binding *in vitro*. **Methods:** After microplate wells had been coated with histatin 3 and control peptide, PGN from *S. aureus* and heat shock protein HSC70 (control) were added to the wells. Then anti-*S. aureus* (a recognizable antibody of PGN) and anti-HSC70 antibodies were used to detect these binding. **Results:** It became evident that PGN binds directly to histatin 3. Binding of HSC70 to histatin 3 could also be confirmed by this experiment. **Conclusions:** Our previous studies have shown that histatin 3 inhibits HSC70-mediated TLR2 and TLR4 signaling (NF- κ B) and the production of inflammatory cytokines by HSC70 in HGFs. Here, PGN-mediated TLR2 signaling was inhibited by binding of PGN to histatin 3. Consequently, it is conceivable that histatin 3 may serve as a suppressive peptide for PGN-inducible inflammation in oral cavity. Histatin 3 is an innate immune factor having the antibacterial and anti-inflammatory effects.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-36 非肥満型糖尿病(NOD)マウスおよびヒト唾液に含まれる抗菌性タンパク質 Bpifb1 の二次元電気泳動解析

○佐藤 律子^{1,2}, 梨田 智子², 水橋 史³, 吉村 建⁴, 下村-黒木 淳子⁵

¹日歯大新潟短大 歯科衛生

²日歯大新潟 生化

³日歯大新潟 補綴 1

⁴日歯大新潟 解剖 1

⁵日歯大新潟 小児歯

【目的】 Bpifb1 は抗菌活性を持つ BPI ファミリーに分類されるタンパク質である。我々は前回の本学会でシェーグレン症候群モデルマウスとされている non-obese diabetic (NOD) マウスではコントロールマウスに比べ Bpifb1 の mRNA が耳下腺腺胞細胞で高度に発現することを報告した。そこで、本研究では細胞分画画分および唾液からの検出を試みた。また、ヒト唾液からの検出も行い低侵襲性マーカーとしての可能性を検討した。

【方法】 雌の NOD/ShiJcl および C57BL/6JJcl マウス (コントロール) を用いた。細胞分画は前報告と同様に行った。マウスからの唾液は、麻酔下 l-isoproterenol-pilocarpine 投与により分泌促進し採取した。Bpifb1 発現は Western blotting により解析した。二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D-PAGE) は IPG strip と IPGphor システム (GE), および nuPAGE (4-10%, Bis-Tris gel, GE) を用いた。ヒト唾液は口腔乾燥外来患者および健常者からの自然唾液を用いた。

【結果】 耳下腺腺胞細胞において、Bpifb1 はコントロールマウスでは検出されなかったが、NOD マウスでは分泌顆粒に局在し、唾液中での分泌が認められた。NOD マウス唾液には分子量がわずかに異なる 2 つの型の Bpifb1 が存在していた。これらは *Aleuria aurantia* レクチン (AAL) に結合し、グリコシダーゼ処理により 1 スポットとなったことから、糖鎖を含むことが分かった。一方、ヒト唾液には Bpifb1 を含むものと含まないものがあった。

【考察】 唾液中に分泌される Bpifb1 は、疾患あるいは体質マーカーとなる可能性があるが、反映する体質および疾患は今後詳細な検討が必要と考える。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

2D-PAGE analysis of saliva from non-obese diabetic (NOD) mice and human subjects

○Sato R^{1,2}, Nashida T², Mizuhashi F³, Yoshimura K⁴, Shimomura-Kuroki J⁵

¹Nippon Dent Univ Coll at Niigata

²Dept Biochem, Nippon Dent Univ at Niigata

³Dept Remov Prosthodont, Nippon Dent Univ at Niigata

⁴Dept Anat, Nippon Dent Univ at Niigata

⁵Dept Pediatr Dent, Nippon Dent Univ at Niigata

Objective: To show the presence of Bpifb1 protein, a member of the bactericidal/permeability-increasing protein family, in saliva from non-obese diabetic (NOD) mice, an animal model for Sjögren's syndrome.

Materials and Methods: Subcellular fractionation of parotid glands from female NOD (NOD/ShiJcl) mice without diabetes was performed. Immunoblotting after polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunohistochemistry were performed to detect Bpifb1. Saliva from NOD mice and human subjects was analysed using 2-dimensional PAGE (2D-PAGE).

Results: Bpifb1 was present in secretory granules in parotid acinar cells from NOD mice. Bpifb1 was detected in the saliva from NOD mice, whereas the saliva from the control mice did not contain Bpifb1. Two groups of Bpifb1 spots were detected by 2D-PAGE. They reacted with *Aleuria aurantia* lectin (AAL) and were combined after de-glycosylation. Bpifb1 was also detected in saliva from the human subjects.

Conclusions: Bpifb1 protein was present in saliva from NOD mice but not in that from control mice. Bpifb1 in saliva had AAL-reactive carbohydrate chains. Bpifb1 was detected in human saliva, although the condition associated with expression of this protein in humans is unknown. Further investigation would be required for the candidate of low-invasive marker.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-37 ラット耳下腺分泌顆粒と未成熟顆粒間における LC-MS 脂質解析

○加藤 治, 横山 愛, 吉垣 純子

日大松戸歯 生理

【目的】 耳下腺腺房細胞の分泌顆粒はゴルジ体から形成されると、開口放出に備え成熟していく。これまでの検討により形成直後の未成熟顆粒は成熟顆粒に比べ直径が小さく、比重は軽く、膜タンパク質も成熟顆粒とは異なるといった様々な特徴の違いが明らかとなっている。さらに顆粒形成や開口放出に関わるいくつかの膜タンパク質が膜ドメインに検出され、成熟顆粒と未成熟顆粒における局在の違いを認めたことから、膜脂質による成熟過程の制御機構が示唆された。そこで今回、両分泌顆粒間の脂質組成について質量分析装置による網羅的解析を行った。【方法】成熟顆粒は一晩断食させたラット耳下腺より 56%パーコール遠心法にて精製した。一方、未成熟顆粒はβ受容体刺激薬であるイソプロテレノールを腹腔内投与し、5時間後に摘出した耳下腺から精製した。脂質はメタノール混合液により抽出し、高速液体クロマトグラフィー (Agilent 1200 series) と連結した質量分析装置 (LTQ Orbitrap XL) により LC-MS 解析を行った。化合物の網羅的脂質解析にはソフトウェア SIEVE (Thermo Fisher Scientific) と LipidSearch (三井情報株式会社) を使用した。【結果・結論】成熟顆粒、未成熟顆粒ともに精製度は高く、不純物が少ないことを電子顕微鏡観察により確認した。脂質解析の結果、グリセロリン脂質やスフィンゴ脂質、スフィンゴイド類など 124 種の脂質が検出された。しかしながら両分泌顆粒間における主要な膜脂質組成に関してはほとんど違いが認められなかった。現在、顆粒間で脂肪酸の組成に違いがないか詳細な解析を進めている。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

LC-MS analysis of lipid component between mature and immature secretory granules in the rat parotid gland

○Kato O, Yokoyama M, Yoshigaki J

Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Purpose: Secretory granules (SGs) are generated from Golgi complex, then they mature for exocytosis. We have reported that immature secretory granules (ISGs) were smaller than SGs, and that distribution of membrane proteins were different between them. Moreover, some of membrane proteins were detected in membrane microdomains of these secretory granules. Distributions of the membrane proteins were regulated by membrane microdomains during granule maturation. To clear composition of lipid in SGs and ISGs, we performed comprehensive lipid analysis of these granules by LC-MS (Agilent 1200 series-LTQ Orbitrap XL). **Material&Methods:** SGs were purified by 56% Percoll centrifugation from rat parotid glands. ISGs were purified from rats at 5 hours after injection intraperitoneal of isoproterenol. All lipids in the purified granules were extracted by methanol solution for LC-MS analysis. The data of lipid components were analyzed by SIEVE and LipidSearch software. **Results&Conclusion:** We observed ISGs and SGs by electron microscopy to confirm no contamination in them. We detected 124 lipids by LC-MS analysis. However, the proportions of most lipid components such as phospholipids and glycosphingolipids were similar between ISGs and SGs. Now, we examine the difference of fatty acids in each lipid of ISGs and SGs.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-38 睡眠中の口腔内唾液 pH モニタリング

○中村 昭博, 渡辺 泰平, 中村 徳三, 雀部 貴志, 渡辺 幸嗣, 渡部 茂
明海大 歯 小児歯

【目的】睡眠中の口腔内環境の悪化は容易に推測されるが、睡眠中の口腔内環境についての報告は少なく不明である。本研究は睡眠中のエナメル質脱灰についての基礎データを得ることを目的に、睡眠中唾液 pH を部位別に同時モニタリングした。本研究は明海大学倫理委員会承認のもとに行った(承認番号:A1313)。開示すべき COI はない。【方法】対象は全身的に健康な成人 5 名とした。測定にはアンチモン電極 (SP-Sb-032) を用い、24 時間 pH モニター計 (PH-101ZG 2ch) にてモニタリングし、24 時間 pH モニター解析プログラム (W-ICPI Ver2.3) にて解析した。比較電極は体表用比較電極 (CMR-535) を用いた。pH センサーを pH4 および 7 の標準液で 2 点校正後、上顎中切歯唇側面 (UPB) および上顎第一大臼歯頬側面 (UPB) に、それぞれコンポジットレジン系接着剤 (G-フィックス) にて接着し安静を保った状態で実験を行った。およそ 0:00 に就寝後、翌朝およそ 7:00 起床までの睡眠中、1 分間隔でモニタリングした。【結果】完全睡眠(睡眠)に至るまでの安静時唾液 pH は全被験者で UPB が UAL より高い値を示した。睡眠直後より唾液 pH の変動が少なくなり、UAL は速やかに、UPB は徐々に pH が 1 程度下降した。その後両部位の pH は平衡を保ち、UAL は UPB より高い状態が起床時まで続いた。UAL の pH の最低値は 5.5 前後であり、UPB は 5.0 程度であった。【結論】睡眠中の pH は部位によって異なり、UAL は UPB より高く維持されていた。最低 pH は UAL で 5.5、UPB で 5 程度を示した。【利益相反】利益相反状態にはありません。

pH monitoring of oral saliva during sleep

○Nakamura A, Watanabe T, Nakamura N, Sasabe T, Watanabe K, Watanabe S
Div Oral Pediatr Dent, Meikai Univ Sch Dent

Objective: Saliva pH during sleep was monitored for individual parts concurrently aiming at obtaining basic data regarding enamel decalcification during sleep. This study was approved by the Meikai University Ethical Committee (Approval No.: A1313). **Methods:** One pH sensor was attached by adhesive resin to the labial surface of the maxillary central incisor (UAL) and the second was attached to the buccal surface of the upper first molar (UPB) for each healthy five adults subject. Saliva pH was measured from midnight 0:00 to 7:00 a.m. automatically every minute. Antimony electrodes (SP-Sb-032, chemical apparatus, Tokyo) were used for the pH measurements and the results were analyzed by a pH monitor analysis program. **Results:** UPB showed higher resting saliva pH value until they reached complete sleep in all subjects than UAL. With a slight variation in saliva pH since immediately after getting into sleep, pH at both UAL and UPB decreased by approximately 1. but quickly and gradually, respectively. With pH of the both site kept balanced subsequently, higher pH condition at UAL than UPB continued until the time of awakening. Minimum pH value at UAL and UPB indicated around 5.5 and 5.0, respectively. **Conflict of Interest:** The authors declare no competing interests.

P2-39 マウス顎顔面領域におけるリンパ管発生

○田谷 雄二, 白子 要一, 佐藤かおり, 添野 雄一

日歯大 生命歯 病理

【目的】 マウス胎仔でのリンパ管発生は、胎生 9.5 日より体幹部主静脈からリンパ管内皮細胞が分化し、全身のリンパ管へと発展していくことが知られている。本研究では、顎顔面領域におけるリンパ管内皮細胞の分化とリンパ管の発生機序について検討した。【方法】 胎生 9.5~18.5 日の ICR マウス胎仔の連続パラフィン切片を作成した。リンパ管内皮細胞 (Vegfr3・Lyve1・Ccl21) とその分化誘導因子 (Prox1), 静脈内皮細胞 (CoupTF2・Endomucin) の特異抗体を用いた多重免疫染色により、体幹部主静脈でのリンパ管内皮細胞の分化から顎顔面領域でのリンパ管の形態形成までの過程について解析した。【結果と考察】 胎性 9.5 日に体幹部の主静脈から分化したリンパ管内皮細胞の表現型は Prox1 (+)/Vegfr3 (+)/Lyve1 (+)/CCL21 (-)/Endomucin (+)であったが、顎顔面領域に向けて個々に分散して遊走し始めると Lyve1 (-)となった。これらのリンパ管内皮細胞は胎生 10.5 日で顎顔面領域に到達し、胎生 11.5 日で小集団を形成し始めた。この時期のリンパ管内皮細胞は CCL21 (+)/Endomucin (-)となり、その分布は下顎突起付近に限局していた。この経路とは別に、頸部に形成されたリンパ叢からリンパ管内皮細胞が下顎突起に遊走するのが観察された。胎生 12.5 日になると、一部の小集団では内皮細胞が連なってリンパ嚢を形成しはじめた。内腔を有するリンパ管は胎生 14.5 日で明瞭となり、リンパ管内皮細胞の表現型は Lyve1 (+)に復帰した。その後、出生直前までに、異なるサイズのリンパ管形成が顎顔面全域に進展した。これらの解析から、顎顔面領域のリンパ管は体幹部主静脈と頸部リンパ叢の内皮細胞に由来し、表現型の変遷を経て形態形成を遂げ、顎顔面全域に分布するようになることが確かめられた。本研究は JSPS 科研費 #26462799 の助成を受けた。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Morphology of lymphatic vasculature in the craniofacial region of embryonic mice

○Taya Y, Shirako Y, Sato K, Soeno Y

Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

We herein focused on differentiation of the lymphatic endothelial cells (LECs) and development of the lymphatic vessels in the craniofacial region of embryonic mice. ICR mouse embryos from E9.5-18.5 were used to collect the samples. The serial sections were multiple-immunolabeled with Prox1/ Vegfr3/ Lyve1/ Ccl21 (LEC markers) and CoupTF2/ Endomucin (venous endothelial cell markers). Our immunohistochemical analysis demonstrated that when LECs differentiated and sprouted from the common cardinal veins in the trunk, LECs showed Prox1 (+)/ Vegfr3 (+)/ Lyve1 (+)/ Ccl21 (-) at around E9.5. Their LECs scattered, migrated away forward the craniofacial region and arrived at the mandibular arches at around E10.5. Their migrating LECs showed Lyve1 (-). LECs aggregated and formed the small cell masses at E11.5. LECs became to show Ccl 21 (+) and Endomucin (-). As another path, it was observed that LECs migrated from lymphatic plexus of the cervical region into mandibular arches. The lymph sacs and lymphatic vessels were beginning to form after around E12.5 and E14.5, respectively. Thereafter, the distribution of their lymphatic vessels gradually extended in the craniofacial region. We established the developmental process of lymphatic vessels that originated from the common cardinal veins and lymphatic plexus in the craniofacial region. Supported by JSPS KAKENHI Grant number 26462799.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-40 マウス胚子の顎顔面形態形成における顔面突起の fusion と merging の差異に関する研究

○杉山 明子, 滝川 俊也, 河野 芳朗

朝日大 歯 口腔解剖

【目的】顎顔面は胎児期に原始口腔を取り囲んで発生する顔面突起が相互に癒合することにより形成されるが、この癒合現象には、本来、fusion (true fusion, '真の癒合') と merging (ostensible fusion, '見かけ上の癒合') という2つの全く異なる様式がある (Patten, 1961)。すなわち、fusion とは、互いに離れた2つの突起同士が接触し、上皮性縫合を形成した後、上皮が消えて間葉が合流する現象である。一方、merging は、元々一続きの構造に2つの隆起が生じた後、隆起間の上皮が間葉の増殖によって押し出される現象である。これら fusion と merging の差異は、顎顔面の正常発生および先天性裂奇形の発症機序や顔裂性嚢胞の嚢胞壁上皮の由来を理解するうえできわめて重要であるにもかかわらず、それぞれの顔面突起間で起こる癒合が fusion と merging のどちらであるのかを詳述した成書および論文はない。今回、fusion と merging の差異を明らかにするために形態学的な解析を行った。

【方法】ICR マウス胚子を用いて、顎顔面の正常形態形成で起こる癒合過程を走査電子顕微鏡法、ナイルブルー生体染色法、TUNEL 法および免疫染色法などにより解析した。

【結果と考察】各顔面突起癒合部上皮細胞のフィロポディアの形成やプログラム細胞死 (アポトーシス)、および上皮基底膜の分解の有無などを基準にした場合、各顔面突起間で起こる癒合が fusion と merging のどちらであるのかを明瞭に区別できることが明らかになった。さらに顔面原基の器官培養法を用いた実験により、fusion を起こす部位の顔面突起上皮細胞は間葉細胞へトランスフォームする潜在的能力を有する可能性が見出された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

A study on the difference of fusion and merging of facial processes in the maxillofacial morphogenesis of mouse embryos

○Sugiyama A, Takigawa T, Kawano Y

Dept Oral Anat, Div Oral Struct, Function Dev, Asahi Univ Sch Dent

Purpose: The maxillofacial portion is formed by the so-called "fusion" of facial processes during the embryonic period. However, the "fusion" includes two mutually different processes, namely "fusion (true fusion)" and "merging (ostensible fusion)," as defined by B. M. Patten (1961). We aimed to clarify the difference between "fusion (true fusion)" and "merging (ostensible fusion)" by establishing new criteria to distinguish the two phenomena during the maxillofacial morphogenesis of mouse embryos.

Materials & Methods: We analyzed the maxillofacial morphogenesis of mouse embryos at around days 9–12 of pregnancy by performing histological analysis and SEM. In addition, we analyzed the potential of epithelial cells in fusion areas to cause epithelial–mesenchymal transdifferentiation (EMT) using an organ culture system developed by us.

Results & Conclusion: We found that the so-called "fusion" was distinguishable into "fusion (true fusion)" and "merging (ostensible fusion)" by a combination of morphological and histological criteria, such as the formation of epithelial filopodia, presence or absence of epithelial cell death, and disruption of subepithelial basement membrane. Furthermore, it was found that epithelial cells in the areas where "fusion (true fusion)" occurs have the potential to cause EMT *in vitro*.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-41 顔面発生時の神経堤細胞における恒常的 BMP シグナル活性化の影響

○戸田 雅子, 岡 暁子, 尾崎 正雄

福歯大 小児歯

【背景】ヒトにおける BMP シグナルの異常亢進は、進行性骨化性線維異形成症で見られ、これは BMP I 型受容体 ACVR1/ALK2 の遺伝子変異によるものであることがわかっているが、顎顔面発生については不明である。今回我々は、類似の変異を持つ ACVR1 を導入することにより、神経堤細胞において BMP シグナルを恒常的に活性化させたマウスを 2 系統作製し、表現型を比較した。【方法】神経堤細胞特異的に Cre を発現する P0-cre マウスと BMP I 型受容体 Acvr1 遺伝子を変異させた Constitutively activated Acvr1 (caAcvr1) flox マウスを交配し、P0-cre;caACVR1 コンディショナル過剰発現マウスを 2 系統作製した (L35, A11 系統)。骨・軟骨形成の評価は、アルシアンプルーとアリザリンレッド染色にておこなった。組織切片を作製し、HE 染色、Safranin-O 染色を施行した。【結果・考察】2 つの系統 L35 と A11 は異なる表現型を示した。L35 系統マウスは、上顎と鼻に著しい低形成がみられ鼻腔形成が障害されていた。さらに上顎骨内や舌に異所性の軟骨が散在していた。A11 マウスは、正中鼻突起の形成がなく正中部での上顎突起の癒合が生じていなかった。しかし、鼻腔は存在し、異所性軟骨の存在は確認されなかった。これらの結果から、神経堤細胞における BMP シグナルは中顔面形成に重要であること、胎生初期での軟骨細胞分化を制御していることが明らかとなった。つまり、顔面発生において BMP シグナルは、シグナル抑制を含めて、時間-空間的に適切に制御されることが重要であることが示唆された。この 2 系統のマウスは顔面領域での BMP シグナルの細胞分化制御の解明に有用なモデルとなる。非会員共同研究者：三品裕司 (University of Michigan, School of Dentistry)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The effect of constitutive activation of BMP signaling in neural crest cells during craniofacial development

○Toda M, Oka K, Ozaki M

Sect Pediatr Dent, Dept Oral Growth Dev, Fukuoka Dent Coll

Background: Fibrodysplasia ossificans progressive is caused by hyperactive BMP signaling with a mutation in ACVR1/ALK2, however its role has little known in craniofacial development. We generated two mice lines with neural crest-specific conditional activation of constitutively activated Acvr1 (L35 and A11 lines) and compared their craniofacial phenotypes.

Material & Methods: Paraffin sections were made and stained with Hematoxylin and Eosin, and safranin O. For skeletal staining, skinned head were stained with alcian blue and alizarin red.

Results and Discussion: L35 mouse line showed nasal and maxillary deformations without the nasal cavity. Interestingly, numbers of ectopic cartilage nodules were observed in maxilla, palate and tongue. In A11 mouse line, the frontonasal process was defected and maxillary processes were not fused. Unlike L35, A11 mice developed the nasal cavity without formation of ectopic cartilage. These phenotypic differences found in the two mouse lines suggest that BMP signaling in neural crest cells has a crucial role for mid-facial development. It also suggests that BMP signaling levels need to be precisely regulated for osteochondrogenic cell differentiation in craniofacial development. These two mutant mouse lines are useful model to investigate BMP signaling in craniofacial ossification. (Non-member co-author; Dr. Mishina Y)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-42 コンドロイチン硫酸は頭蓋顔面形態形成を制御している

○依田 浩子¹, 森田 航², 柴田 俊一³, 大島 勇人¹

¹新潟大 院医歯 硬組織形態

²北大 院歯 口腔機能解剖

³医科歯科大 院医歯 顎顔面解剖

【目的】 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) は主要な細胞外基質の一つで、とくに神経および軟骨組織の発生過程で重要な役割を果たしていることが知られている。今回我々は、CS合成のキーエンザイムである Chondroitin sulfate N-acethylgalactosaminyltransferase-1 (Csgalnact-1) の遺伝子ノックアウト (KO)マウスの頭蓋顔面形態変化について解析し、頭蓋顔面発育過程におけるCSの機能的役割について検討した。**【方法】** 胎生15日から生後1年までの各発育段階のCsgalnact-1 KOマウスを4% PFAにて灌流固定し、頭部組織についてマイクロCTならびに組織切片を用いた形態学的検索を行った。さらにCS関連分子について、蛋白質および遺伝子レベルでの発現変化について解析した。**【結果と考察】** Csgalnact-1 KOマウスには、眼および鼻腔の形成不全、唇裂・口蓋裂を生じる個体が観察された。それらの顔面奇形を伴わない個体はほぼ正常な生後発育を示したが、頭蓋骨の形態変化、二次口蓋の菲薄化と癒合不全、切歯反対咬合等の不正咬合が確認された。組織学的には頭蓋底軟骨結合、下顎頭軟骨および鼻軟骨に、細胞増殖の減少ならびに肥大化軟骨層の菲薄化を伴う軟骨組織の低形成が確認された。さらにWNT関連分子およびIhh, FGFsなどのCS関連分子の遺伝子発現低下が確認された。以上より、顎顔面形態形成にCSが重要な役割を果たしていることが示唆された。(会員外共同研究者:愛知医科大・医生物・細胞生物 武内恒成)

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Chondroitin sulfate regulates the craniofacial morphogenesis

○Ida-Yonemochi H¹, Morita W², Shibata S³, Ohshima H¹

¹Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent

²Dept Oral Functional Anat, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

³Div Maxillofac Anat, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) is one of major extracellular matrices and is known to play an important part in organogenesis. To elucidate the role of CS in craniofacial development, we analyzed the craniofacial morphology in chondroitin sulfate N-acethylgalactosaminyltransferase-1 (Csgalnact-1) gene knockout (KO) mice. Some of Csgalnact-1 KO mice exhibited severe facial developmental defect such as eye defect, hypoplasia of nasal cavity and cleft lip and palate. Although most of Csgalnact-1 KO mice showed normal postnatal development, they exhibited the deformation of cranial bone, dysrhapsism of secondary palate and malocclusion. Histologically, the cranial base and mandibular condyle contained disorganized chondrocyte columns with reduced cell proliferation. Immunohistochemical and RT-PCR analyses revealed that the level of WNT-related molecules, Ihh and FGFs were downregulated in KO cartilage. These results suggest that CS chain is necessary for normal craniofacial morphogenesis. (Non-member coworker: Kosei Takeuchi, Dept of Biol, Sch of Med, Aichi Med Univ)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-43 ラット胚における外胚葉-内胚葉のオーバーラップ層の頭蓋顔面の器官の発生開始への寄与

○今井 元¹, 鈴木 礼子²

¹奥羽大 歯 生物

²奥羽大 歯 歯科薬理

両生類では、神経胚期の前腸内胚葉は、まず、口腔外胚葉へ陥入し、外胚葉と内胚葉のオーバーラップ層を形成し、隣接する口腔外胚葉において将来の歯と腺性下垂体のフィールドを決定する。しかしながら、両生類の神経胚に相当する胎齢9.25日のラット胚は非常に脆弱なため、外胚葉と内胚葉のオーバーラップ層の分布を明らかにすることは非常に困難であった。したがって、哺乳類における外胚葉と内胚葉のオーバーラップ層が頭蓋顔面の器官発生にどのように寄与するかについては、ほとんど知られていない。そこで、哺乳類における外胚葉と内胚葉のオーバーラップ層の歯と腺下垂体の発生への寄与を明らかにすることを本研究の目的とした。我々は、まず、E9.25ラット胚に対するDiIとade-lacZによる標識を行い、全胚培養と器官培養下で、前方中軸中内胚葉-追跡実験を行った。LacZ陽性の内胚葉由来の細胞は、ラトケ囊の周囲の領域に移動し、上下顎隆起の上皮の口腔外胚葉上に分布していた。また、DiI-陽性細胞は、それらの器官原基に隣接した領域でshh-発現細胞やLHβ-発現細胞に分化した。さらに、前方中軸中内胚葉の除去実験において、内胚葉の部分を除去すると歯胚発生関連遺伝子が消失し、脊索前板部分を除去すると、腺性下垂体発生関連遺伝子の発現も消失した。これらの結果は、哺乳類において外胚葉と内胚葉のオーバーラップ層が腺下垂体と歯の発生開始に寄与することを示す最初の直接的証拠である。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The contribution of the overlapping layer of ectoderm and endoderm to the developmental initiation of craniofacial organs in rat embryos

○Imai H¹, Suzuki R²

¹Div Biol, Ohu Univ Sch Dent

²Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent

In amphibia, the foregut endoderm of neurula initially invaginates itself into the stomodeal collar of oral ectoderm and forms the layer to overlap each other, after which the oral ectoderm adjacent to the layer determines the fields of prospective teeth and adenohypophysis. However, the rat embryos of E9.25, corresponding to amphibian neurula, are too feeble to detect the distribution of the layer. Therefore, little is known of the contribution of the overlapping layer to craniofacial organs in mammals. To elucidate the contribution of the overlapping layer between endoderm and ectoderm in the development of tooth and adenohypophysis, we performed the axial mesendoderm-tracing with the labeling with DiI and ade-lacZ in E9.25 rat embryos, after which the development of organs were maintained in the whole embryo culture and the organ cultures. The LacZ-positive endoderm derivatives migrated to the surrounding region of RP and the derivatives were also distributed in maxillary / mandibular epithelia on oral ectoderm. Moreover, the DiI-positive cells differentiated to shh-expressing cells and LHβ-expressing cells adjacent to the prospective organs. These findings show the first direct evidence that the overlapping layer of ectoderm and endoderm contributes to the initiation of the development adenohypophysis and tooth in mammals.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-44 舌筋パターンニングにおける Shh シグナル

○奥原 滋, 井関 祥子

医科歯科大 院医歯 分子発生

Sonic hedgehog (Shh) シグナリングは哺乳類の発生において多様な役割を果たすことが知られている。また、発生中の口蓋と舌の上皮における Shh の発現は組織特異的なエンハンサー MFCS4 に制御されていることが近年明らかになった。Shh と MFCS4 を共にヘテロ欠失させたマウス (MFCS4^{+/-}; Shh^{-/+}) は、口蓋突起の挙上に失敗して口蓋裂を呈するが、口蓋突起には大きな異常がなかったため、この口蓋裂は主に舌の機能不全に起因すると考えられた。そこで舌を詳細に検討したところ、MFCS4^{+/-}; Shh^{-/+} マウスの舌筋は分化を遂げているが、その配列は整然さを失っていた。同時に、*Sox9* と *Scleraxis* の発現を調べたところ、舌中隔と舌腱膜が低形成であった。一方、CreERTM; Shh^{loxP/loxP} マウスを用いて、頭部神経堤細胞と筋芽細胞が舌原基中に混在する E10.5 以降で Shh の発現を失わせた。Shh シグナリングの低下を *Ptch1* と *Gli1* の発現の低下で確認した。このマウスの解析から、舌中隔と舌腱膜の発生は E10.5 以降に起こることが明らかになった。これらの結果から、舌上皮に発現する Shh は、頭部神経堤細胞由来の間葉細胞から舌内の腱への分化に影響し、これが筋管のパターンニングに貢献することが示唆された。すなわち、舌パターンニングにおける Shh シグナリングの役割が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Shh signaling during patterning of the murine tongue

○Okuhara S, Iseki S

Div Mol Craniofac Embryol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Sonic hedgehog (Shh) signaling has diverse roles in mammalian development. Shh expression in epithelium of the developing palate and tongue is regulated by the tissue-specific enhancer MFCS4. The compound heterozygous deletion mouse of Shh coding region and MFCS4 (MFCS4^{+/-}; Shh^{-/+}) results in cleft palate, which is likely due to a dysfunctional tongue rather than impaired palatal shelves. The mutant tongue shows disorganized arrangement of myotubes but myotube differentiation does not seem to be affected. The aponeurosis and lingual septum are hypoplastic and aplastic, respectively; confirmed by decreased expression of *Sox9* and *Scleraxis*. Targeted deletion of *Shh* in CreERTM; Shh^{loxP/loxP} mice revealed that mesenchymal differentiation into the aponeurosis and the lingual septum occurs from E10.5, when cranial neural crest (CNC)-derived mesenchymal cells and migrating myoblasts appear in the developing tongue region. Downregulation of Shh signaling represented by expression of *Ptch1* and *Gli1* was found in the CNC-derived mesenchymal cells. These results suggest that Shh function in the epithelium affects the differentiation of CNC-derived mesenchyme into a central tendon structure that regulates myotube patterning. Thus, we propose a novel function for Shh signaling in patterning of the murine tongue.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-45 歯髄幹細胞クローン間における分化能および増殖能と細胞周期関連遺伝子の発現解析

○小林 朋子, 鳥居 大祐, 筒井 健夫

日歯大 生命歯 薬理

【目的】培養下の間葉系幹細胞は増殖能に限界があるため、高い増殖能を有する細胞の選別は、再生医療への幹細胞応用に必須である。本研究では単個細胞由来の歯髄細胞クローン間における細胞周期関連遺伝子発現に着目し、多分化能と増殖能、および遺伝子発現について解析した。

【方法】11歳女子埋伏智歯より歯髄細胞を50クローン単離し、増殖能は細胞集団倍加数 (population doubling level: PDL) より算出した。各クローンにおける分化能については石灰化能と脂肪分化能、および軟骨分化能を組織化学染色により解析した。3分化能、または2分化能、もしくは1分化能を持つ合計5クローンについてDNAマイクロアレイを用いてPDL24から29における網羅的遺伝子発現解析を行った。

【結果】5クローンの遺伝子発現データよりGene Ontology解析を行った結果、分化能が異なるクローン間で発現に差異がある遺伝子は、主に細胞周期や細胞増殖関連遺伝子群であった。クローン間の遺伝子発現解析より、3分化能を有し、もっとも増殖力が高い幹細胞様クローンで高発現を示す細胞周期促進遺伝子は、*CDK1*, *CDK2*, *CDK6*と*CCNA2*, および*E2F5*であり、細胞周期抑制遺伝子においては*TGFB1*と*RBI*などが解析された。

【考察】多分化能を有し高い増殖能を示すクローンでは、他のクローンと比較して細胞周期促進と抑制の両方の遺伝子発現が高かったことから、細胞周期関連遺伝子における発現亢進が起きていることが解析された。本研究により、培養初期の遺伝子発現解析による分化能や増殖能の高い細胞のプロファイリングの可能性が示され、再生医療への有用性の高い細胞ソースの抽出への応用が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Analysis of cell cycle related genes, differentiation potential and proliferation in dental pulp stem cell clones

○Kobayashi T, Torii D, Tsutsui T

Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Purpose: High proliferation and differentiation abilities of mesenchymal stem cells are essential for regeneration therapy. In this study, we analyzed the cell cycle related gene expression, proliferation and differentiation potentials of human dental pulp cell clones.

Materials & Methods: Fifty clones isolated from a third molar of 11-years-old female were cultured. Proliferation potential was calculated from cumulative population doubling level (PDL). Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation potentials were analyzed by histochemical staining. Comprehensive gene expressions of clones were analyzed from 24 to 29 PDL by DNA microarray.

Results: Gene expression analysis was performed on five clones (three tri-potential clones, one bi-potential clone and one uni-potential clone). The highest proliferative tri-potential clone showed stronger expression of cell cycle-promote genes compared with other tri-potential clones, for instance that *CDK1*, *CDK2*, *CDK6*, *CCNA2* and *E2F5*. In addition, the clone showed cell cycle-arrest gene expressions, for instance that *TGFB1* and *RBI*.

Conclusion: Our data suggest that proliferation and differentiation potentials of cloned cells may be reflected on a part of cell cycle related genes.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-46 Crouzon 症候群患者に由来する歯髄幹細胞の特性解析

○鳥居 大祐, 松井美紀子, 小林 朋子, 筒井 健夫

日歯大 生命歯 薬理

【目的】 Crouzon 症候群は、頭蓋変形・眼球突出・中顔面低形成などを主徴とする、頭蓋骨縫合早期癒合症候群の 1 つである。本研究では、Crouzon 症候群と診断を受けた患者の歯髄組織から得られた歯髄幹細胞の、血清含有培地（血清群）または無血清培地（無血清群）における、*in vitro* での細胞増殖能と石灰化分化能、および *in vivo* での組織形成能を比較検討した。

【方法】 歯髄幹細胞は血清含有培地で 1 継代培養後、血清群または無血清群で培養を行った。両群は *in vitro* においては細胞増殖曲線の解析と石灰化誘導、および RT-PCR の解析を行い、*in vivo* ではヌードマウスへの皮下移植後、組織学的検査を行った。

【結果】 歯髄幹細胞の細胞形態については、血清群では線維芽細胞様の細胞が観察されたのに対し、無血清群では細長い紡錘形の細胞が観察された。細胞増殖曲線からは、4 日目においては血清群で、無血清群よりも高い増殖率が解析された。RT-PCR より、両群で幹細胞関連遺伝子である *OCT3/4* と *NANOG*、および *CD146* の発現が解析された。石灰化分化能については、両群においてそれぞれ石灰化誘導培地で培養後、alizarin red 陽性像が観察された。また、qRT-PCR の結果より、健常者の歯髄幹細胞と比較して、硬組織形成関連遺伝子である *bone sialoprotein (BSP)* の低発現が解析された。さらに、ヌードマウスの皮下移植片においては、象牙質/歯髄様複合体形成が観察された。

【考察】 本研究より、Crouzon 症候群の患者の歯髄組織に由来する歯髄幹細胞は、血清含有または無血清培地での培養において、幹細胞関連遺伝子の発現と石灰化分化能、および象牙質/歯髄様複合体形成が観察され、歯髄再生医療において患者由来の細胞を用いた歯髄再生への可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Characterization of dental pulp stem cells isolated from a patient diagnosed as Crouzon syndrome

○Torii D, Matsui M, Kobayashi T, Tsutsui T

Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Purpose: In this study, we analyzed cell proliferation, mineralization, and tissue regeneration of dental pulp stem cells (DPSCs) isolated from a patient diagnosed as Crouzon syndrome using serum-based (S-medium) and serum-free medium (SF-medium) for culture.

Methods: We cultured DPSCs isolated from Crouzon syndrome (CS-DPSCs) with serum-containing medium until passage 1, and subsequently, cultured CS-DPSCs separated SF-medium from S-medium culture. We analyzed cell proliferation, mineralization, and gene expression in CS-DPSCs by RT-PCR *in vitro*. Furthermore, we histologically analyzed transplanted CS-DPSCs.

Results: Proliferation rate of CS-DPSCs in S-medium was higher than those in SF-medium at day 4. RT-PCR assay of S-medium and SF-medium revealed expression of *OCT3/4*, *NANOG*, and *CD146*. Induced osteogenic differentiation of S-medium and SF-medium were positive for alizarin red staining. Furthermore, S-medium and SF-medium transplants showed dentin/pulp-like complex by histological analysis.

Conclusion: Cultured CS-DPSCs with S-medium and SF-medium showed expression of multipotency-related genes and mineralization *in vitro*, and formed dentin/pulp-like complex *in vivo*. Our data suggest that possibility of regenerative therapy using patient own DPSCs.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-47 象牙芽細胞における *Nestin* 遺伝子の発現制御機構

○中富 満城¹, Quispe-Salcedo Angela², 依田 浩子², 大島 勇人²

¹九歯大 解剖

²新潟大 院医歯 硬組織形態

【目的】 *Nestin* 遺伝子は TypeVI 中間径フィラメントをコードし、中枢神経系の神経幹細胞で特異的に発現する事が知られている。 *Nestin* は象牙芽細胞の分化マーカーとしても広く用いられているが、象牙芽細胞における発現制御機構については未解明な点が多い。本研究において我々は *Nestin* 遺伝子の second intron enhancer にリポーター遺伝子として *EGFP* を結合させた *Nestin-EGFP* トランスジェニックマウスを用いて、象牙芽細胞における *Nestin* の発現制御が神経細胞と同様の機構によるか検討した。

【方法】 生後 1 日, 7 日, 3 週, 8 週齢の *Nestin-EGFP* マウスの頭部を 4% PFA で固定後, 脱灰, 脱水, パラフィン包埋して切片を作成した。抗 *Nestin* 抗体および抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色ならびに *Nestin* の antisense プローブを用いた *in situ* hybridization 実験を行い、生後の歯髄における GFP の発現パターンが内在性の *Nestin* 発現と一致するか比較した。

【結果】 切歯と臼歯の双方において、 *Nestin* の mRNA とタンパクの発現は分化した象牙芽細胞に限局していた。一方 GFP 強陽性発現は象牙芽細胞下層に観察され、特に臼歯の髄角部において著明であった。

【考察】 神経系においては GFP と内在性の *Nestin* の発現が一致する事が知られているが、歯髄においては一致しなかった事から、象牙芽細胞においては second intron enhancer 以外の領域が *Nestin* の発現を制御している可能性が示唆された。この結果は外胚葉由来である神経細胞と外胚葉性間葉である神経堤細胞を起源とする象牙芽細胞の間の胚葉由来の相違が反映していると考えられる。

非会員共同研究者：岡野栄之（慶應大・医・生理）

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The regulatory mechanism of *Nestin* gene expression in mouse odontoblasts

○Nakatomi M¹, Quispe-Salcedo A², Ida-Yonemochi H², Ohshima H²

¹Div Anat, Kyushu Dent Univ

²Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

The *Nestin* gene encodes Type VI intermediate filament and is known to be a marker for neural stem cells. Although *Nestin* has been widely used as a differentiation marker for odontoblasts, it is still unclear how *Nestin* expression is regulated in differentiated odontoblasts. This study aimed to clarify whether the gene regulatory mechanism of *Nestin* in odontoblasts is the same as in neural cells by analyzing *Nestin-EGFP* transgenic mice where the second intron enhancer of *Nestin* is connected with the *EGFP* element as a reporter gene. As a result of *in situ* hybridization for *Nestin* and immunohistochemistry for *Nestin* and GFP analyses, it was revealed that endogenous *Nestin* expression was restricted in differentiated odontoblasts while GFP positive cells were mainly observed in the subodontoblastic layer especially in the pulp horn region of molars. In contrast, the expression patterns of GFP and endogenous *Nestin* are overlapping in neural cells. These data suggest that not the second intron enhancer but some other genetic regions may regulate *Nestin* expression in odontoblasts, which are originated from neural crest cells whereas neural cells are derived from ectoderm.

Non-member coworker: Hideyuki Okano (Dept of Physiol, Sch of Med, Keio Univ)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-48 スフェロイド形成による骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化誘導

○中塚美智子¹, 細矢 明宏², 隈部 俊二¹, 田村 功¹

¹大歯大 歯 口腔解剖

²松歯大 歯 口腔解剖 II

【目的】ラット脛骨骨髄由来細胞を用い、スフェロイド形成による軟骨細胞への効率的な分化誘導法について検討した。【方法】Wistar 系雄性ラット 5 匹 (5 週齢) の脛骨骨髄を無菌的に摘出し、細胞を単離した。Minimum essential medium Eagle に certified fetal bovine serum (10% FBS), 50 ng/ml basic FGF, antibiotic-antimycotic, 2mM L-glutamine を添加して初代培養した後、2-3 回継代した。細胞を 2 ml クライオチューブに播種し (1.0×10^6 cells/ml), Dulbecco's modified Eagle's medium - high glucose に 1% FBS, 1% insulin - transferrin - selenite (ITS), dexamethasone ($0.1 \mu\text{M}$), sodium pyruvate (1mM), TGF β -3 (10 ng/ml) を添加して超小型シーソーシェーカー上で培養し、スフェロイドを形成させた。分化誘導開始 21, 28 日後にスフェロイドを回収し、ゲルに包埋後凍結切片を作製した。通法によりアルシアンブルー染色を行った。また軟骨細胞への分化を確認するため、type-II collagen, Sox 9 の発現を免疫組織化学的染色によって検索した。培地に TGF β -3 を添加せずに培養したものを対照群とした。【結果】実験群では培養後 7 日までに細胞がスフェロイド状の構造物を形成した。また、培養後 21 日および 28 日においてアルシアンブルーおよび type-II collagen による著明な染色像を得た。【結論】骨髄由来細胞を軟骨細胞に分化誘導させるのに、細胞を振盪させ、スフェロイドを形成させる方法が有用であると示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells are differentiated into chondrocyte-like cells by forming spheroids *in vitro*

○Nakatsuka M¹, Hosoya A², Kumabe S¹, Tamura I¹

¹Dept Oral Anat, Osaka Dent Univ

²Dept Oral Histol, Matsumoto Dent Univ

To elucidate the chondrocyte differentiation ability of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, we experimented with the cells that formed spheroids *in vitro*. We isolated mesenchymal cells from rat bone marrow (Wistar rats; male, 5weeks), which the cells were cultured by culture media (certified fetal bovine serum (10% FBS), antibiotic-antimycotic, 50 ng/ml basic FGF and 2mM L-glutamine-containing). After the cells were subcultured twice, the cells were cultured with shaking into cryo vials (1.0×10^6 cells/ml) and incubated in culture media (1% FBS, 1% insulin - transferrin - selenite (ITS), dexamethasone ($0.1 \mu\text{M}$), sodium pyruvate (1mM), TGF β -3 (10 ng/ml-containing). The differentiation of the spheroids that the cells formed (day 21 and 28 specimens) was assayed. Cell differentiation was evaluated by Alcian blue staining. We also examined immunohistochemically by using Type-II collagen and Sox9 antibodies. In the experimental group, cells were formed spheroid-like structures at 7 days after the induction. After 21 and 28 days, these structures showed positive reaction of Alcian blue, type II collagen, and Sox9. On the other hand, there were no evidences of chondrocyte differentiation in the control group. Therefore, these results suggest that spheroid formation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells might be useful in chondrocyte regeneration therapy.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-49 Effect of the functional appliance on the condyle growth in rats

○朱 成淑¹, Kim Ji-Youn¹, Owtad Payam², Park Jae Hyun², Shin Je-Won¹

¹慶熙大 齒科大 口腔解剖

²嘉泉大 保健科学大 齒科衛生

○Jue SS¹, Kim JY¹, Owtad P², Park J², Shin JW¹

¹Dept Oral Anat, Sch Dent, Kyung Hee Univ

²Dept Dent Hygiene, Coll of Health Sci, Gachon Univ

Objective: The aim of this study was to develop a simple, convenient, and functional animal model to reproduce the orthodontic effects of functional appliances. **Methods:** The appliance was mounted onto upper jaw of 5 week-old Sprague-Dawley rats and 3, 7, 14, 21, and 28 days onward, animals were sacrificed. Metric analysis was carried out by measurements from micro-CT taken from sacrificed animals.

Results: Condyle width was increased initially after mounting of functional appliance but was not changed afterwards. Condyle was observed to position more to the anterior than control 3 days after functional appliance application, but relocated to the similar position as control with time. Mandibular length was increased by 7 days after functional appliance application than control, but the difference was gradually diminished with time. Mandibular height was steadily increased after functional appliance application than control. Based on these results, comparison between effects of animal model and clinical cases were carried out and showed that prognosis of experimental functional appliances were similar to that of previous clinical studies. **Conclusions:** These results suggested that this experimental animal model could provide a reliable and testable way to elucidate the important histological and biochemical changes induced by clinical functional appliance.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-50 オステオネクチンは AP-1 活性を抑制して脂肪細胞分化を抑制する

○前田 豊信, 鈴木 厚子, 加藤 靖正

奥羽大 歯 口腔機能分子

【目的】オステオネクチン (ON/SPARC) は、約 40 kDa のシステインが豊富な酸性の細胞外マトリックスタンパク質で、カルシウムや 1 型コラーゲンと親和性を有する骨基質タンパク質としても知られている。ON のノックアウトマウスの表現型は、白内障や骨減少症の発症と皮下脂肪の増加が知られている。最近 ON の細胞内でのシグナル調節機能が示唆されている。本研究では、AP-1 活性に着目し、間葉系前駆細胞における細胞内での ON の機能解析を行った。【方法】間葉系細胞の分化 (骨芽細胞分化, 脂肪分化) に及ぼす ON の影響を解析する目的で、ST-2 細胞に CRISPR-Cas9 を導入して ON ノックアウト細胞株を作製した。AP-1 活性はレポーターアッセイにより評価した。Brevibacillus を用いたリコンビナントタンパク質発現系により、ヒト完全長の ON (ON^{AA1-284}) と 2 種類の ON 断片 (ON^{AA1-118}, ON^{AA119-284})、あるいは c-Fos, c-Jun を精製した。これらのリコンビナントタンパク質を用いて、ON の c-Fos もしくは c-Jun に対する結合能をファウエスタンプロット法にて解析した。【結果と考察】ON をノックアウトした ST-2 細胞では、スタチンによる骨分化促進作用は完全に消失し、細胞内の脂肪滴の蓄積は有意に増加した。一方、ON は c-Jun よりも c-Fos と強く結合した。この結合には AA1-118 領域を介していることが示された。これらのことから、ON は c-Fos との直接結合により AP-1 活性を抑制することで間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進していることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Osteonectin inhibits adipocyte differentiation by suppressing AP-1 transcriptional activity

○Maeda T, Suzuki A, Kato Y

Div Oral Func Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent

Objective: Osteonectin (ON / SPARC) is an acidic extracellular protein with 40-kDa. The major phenotypes of ON knockout mice were cataract and osteopenia onsets and increase in adipose tissue. Recent studies have suggested that ON modulates intracellular signaling. In the present study, we determined the role of intracellular function of ON for AP-1 activity in mesenchymal progenitor cell differentiation.

Method: To confirm whether ON affects the mesenchymal cell differentiation such as osteogenesis and adipogenesis, we established ON knockout ST2 cells by using the CRISPR-Cas9 system. AP-1 transcription activity was measured by luciferase reporter assay. In order to test protein binding ability of ON to AP-1 proteins *in vitro*, we purified following recombinant proteins: full length ON (ON^{AA1-284}), the ON fragments such as ON^{AA1-118}, ON^{AA119-284}. AP-1 binding activity of ON was determined by the far-western blotting. **Results & Conclusion:** The knockout of ON completely abolished statin-induced mineralization and significantly increased accumulation of lipid droplets in ST-2 cells *in vitro*. Far-western blot assay showed that ON^{AA1-284} bound preferentially to c-Fos whose binding was tightly associated with AA1-118 region. These results suggested that ON is responsible for increase in bone density and decrease in adipogenesis through, at least in part, the AP-1 inhibition.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-51 烏賊骨粉末の骨芽細胞増殖効果の評価

○Suwanna Korsuwannawong

Res Off, Fac Dent, Mahidol Univ

Evaluation of the proliferative effect of cuttlefish bone powder on osteoblasts

○Korsuwannawong S

Res Off, Fac Dent, Mahidol Univ

Backgrounds & Purpose: Cuttlefish bone is a brittle internal structure found in all members of the family cephalopods. It is a chambered, gas-filled shell used for floating control. In the past, goldsmith ground cuttlefish bone up to make polishing powder. The powder was also added to toothpaste, and was used as an antacid for medicinal purposes. To study the cell proliferative effect of cuttlefish bone powder on mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1). **Materials & Methods:** MC3T3-E1 cells were treated with cuttlefish bone powder at concentrations of 0.5 and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. MTT assay was used to determine cell proliferative effect. **Results & Conclusion:** After 16-day treatment, cuttlefish bone induced $123.33 \pm 10.07\%$ and $126.66 \pm 15.69\%$ of MC3T3-E1 cell proliferation compared to control. The result suggests that cuttlefish bone can promote osteoblastic cell proliferation and might be used as a potential material for the benefits of bone defect healing after surgery.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-52 顆粒骨補填材の顆粒間隙と新生血管量について

○戸田 伊紀, 大西 吉之, 上村 守, 川島 渉, 竹村 明道
大歯大 解剖

演者らは、骨補填材を用いた骨増生に関する報告を行ってきた。今回、実験動物の骨欠損に粒径の異なる骨補填材を填入し、顆粒間隙への新生血管量について計測を行った。実験材料には、P, S, M, Lの4種類の β -TCP顆粒を用いた。成カニクイザル3頭の両側下顎臼歯を抜去した。抜歯8週後、抜歯部に直径3.5 mm, 深さ6 mmの骨欠損を形成し、直ちに各顆粒をそれぞれ填入した。また無填入の骨欠損を対照とした。術後2週に実験動物を安楽死させ、両側総頸動脈からアクリル樹脂を注入した。樹脂硬化後、骨欠損を各ブロックに分離したのち水平断して骨・微細血管鋳型標本を作製し、走査電子顕微鏡で観察した。その後、さらに硬組織を除去した微細血管鋳型標本として走査電顕で観察した。電顕像から、画像解析ソフトを用いて骨欠損面積に対する新生血管面積の比率を算定し、新生血管量とした。すべての顆粒で顆粒間隙に新生血管が認められた。またPとS顆粒では新生血管がほぼ均等に認められた。MとL顆粒では、顆粒を取巻くように新生血管が認められた。新生血管量は、PとS顆粒は対照とほぼ同じで、MとL顆粒はやや少なかった。結果から、P・S顆粒では均等に分散した間隙に新生血管が形成され、新生血管量も対照と等しくなった。M・L顆粒では、不均等に分散した間隙に新生血管が形成され、対照に比べて新生血管量がやや少なくなった。これらの新生血管の形成は、後に続く骨形成の量を決める重要な要因と考えられる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Volume of newly formed microvasculature in interspaces of bone substitute granules

○Toda I, Ohnishi Y, Uemura M, Kawashima W, Takemura A
Dept Anat, Osaka Dent Univ

We previously reported regarding bone augmentation with use of bone filling materials. In the present study, we investigated the volume of newly formed microvasculature in interspaces filled with different sizes of granules in experimental animal bone defects. Four different sizes (P, S, M, L) of beta-TCP granules were used. Mandibular molars were extracted from crab-eating monkeys, then 8 weeks later the resulting bone defects were filled with each size. Two weeks after that operation, the animals were euthanized and acrylic resin was injected, and corrosion cast specimens were prepared for SEM examinations. We measured the volume of newly formed microvasculature in the interspaces of the granules shown in SEM images of the corrosion cast specimens using image analysis software. Newly formed microvasculature was observed in specimens with each of the different granule sizes. In specimens with sizes P and S, the newly formed microvasculature showed equal dispersion, while that in those with the M and L sizes surrounded the granules. Based on our findings, we concluded that newly formed microvasculature is an important factor related to the volume of bone formation following tooth extraction.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-53 フィトケミカルの生体調節機能に関する研究—ペチュニジンの骨形成促進作用—

○前田 豊信¹, 長岡 正博², 鈴木 厚子¹, 加藤 靖正¹, 鈴木 恵子²

¹奥羽大 歯 口腔機能分子

²奥羽大 歯 歯科薬理

【目的】アントシアニジンの1つである delphinidin は、クランベリーなどに多く含まれる色素である。このうち、B-環の3つの水酸基のひとつがO-メチル化されている誘導体が petunidin であり、ラズベリーなどに多く含まれる。これらの植物由来成分は抗酸化作用をもつフィトケミカルとして、糖・脂質代謝改善や免疫機能活性化など、さまざまな健康増進効果をあらわすことが報告されている。以前に私たちは、delphinidin が破骨細胞形成を抑制して、*in vivo* で骨吸収を強く抑制することを報告してきた。しかしながら、petunidin が骨芽細胞分化に与える影響については不明な点が多い。そこで本研究では、petunidin が骨芽細胞の分化・増殖に及ぼす影響について delphinidin と比較検討したので、ここに報告をする。【方法】マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に delphinidin あるいは petunidin を 0.1 mM で添加し一定期間培養した。骨分化マーカーの発現を RT-qPCR にて解析し、骨マトリックスタンパクの発現を ELISA, ウェスタンブロットにより定量した。また、NF-κB 活性をレポーターアッセイによって評価した。【結果と考察】0.1 mM の petunidin の添加で、MC3T3-E1 細胞は有意な石灰化の促進を示した。しかし delphinidin の添加では石灰化の促進は認められなかった。また petunidin による石灰化の促進は BMP-2, アルカリフォスファターゼ, オステオポンチン, オステオカルシンなどの発現増加を伴うものであった。また、petunidin の添加では LPS によって誘導される NF-κB 活性の促進は、完全に消失した。このことから、petunidin による石灰化促進機構には、少なくとも NF-κB 活性の抑制が関わっていることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Beneficial health effects of phytochemicals: Stimulatory effect of petunidin on osteoblast differentiation and mineralization

○Maeda T¹, Nagaoka M², Suzuki A¹, Kato Y¹, Suzuki K²

¹Div Oral Func Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent

²Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent

Objective: Delphinidin, one of anthocyanidins, is a natural plant pigment rich in cranberry. Petunidin is a B-ring-O-methylated derivative of delphinidin (3'-O-methyl delphinidin) rich in raspberry. Both of these anthocyanidins have been shown to have a wide range of beneficial health effects including lowering blood sugar and LDL-C, inflammation/immunity regulation, because of their potent antioxidant activity. Our previous study has demonstrated that both delphinidin and petunidin significantly prevented bone resorption *in vivo* through suppressing osteoclast formation. However, the effect of these anthocyanidins on osteoblast differentiation is still unclear. In this study, we determined the effect of petunidin on osteoblast differentiation and compared its activity with delphinidin. **Material & Method:** MC3T3-E1 cells were cultured in a differentiation medium in the presence or absence of 0.1 mM delphinidin or 0.1 mM petunidin. Expression of osteoblast differentiation markers was monitored by RT-qPCR, ELISA, and western blot analyses. NF-κB activity was measured by luciferase reporter assay. **Results & Conclusion:** Petunidin promoted mineralization in MC3T3-E1 cells, while delphinidin did not. This promotion was accompanied by upregulation of BMP-2, ALP, osteopontin and osteocalcin expression. In addition, petunidin completely abolished LPS-induced NF-κB activation. These results indicate that petunidin promotes osteogenesis, at least in part, through suppressing NF-κB activation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-54 Klf4 遺伝子欠損マウスは頭部、四肢の骨格発生異常を示す

○藤川 順司^{1,2}, Nomir Ahmed¹, 竹内 優斗¹, 鬼頭 昭吉^{1,2}, 阿部 真士¹, 脇坂 聡¹

¹阪大 院歯 口腔解剖 1

²阪大 歯病 障害歯

Klf4 はジンクフィンガーモチーフを持ち、体表や消化管上皮の正常発生に必須の転写因子である。以前から骨格発生初期の骨芽細胞に Klf4 が発現していることは報告されていたが、我々は胎生後期に骨芽細胞が成熟する際、その発現が減弱することが必須であることを報告した。また最近、骨芽細胞に発現する Klf4 が骨のリモデリングを制御することが報告され、骨格形態形成およびその恒常性制御に Klf4 が重要な役割を持つことが見出された。今回我々は胎生期に発現する Klf4 の役割のさらなる解明を目的とし、Klf4 遺伝子欠損 (Klf4^{-/-}) マウスの骨格表現型を詳細に解析した。同腹の野生型マウスに比べ、Klf4^{-/-}マウスの下顎は遠位部で左右間の距離が近接しており、それに伴い、顎下腺、舌下腺の導管が圧平されていた。また、下顎近位部の顎関節の正常発生は見られず、上下の関節腔の形成は認められなかった。一方、歯胚と口蓋の発生はともに組織学的に正常に認められた。内軟骨骨化で発生する四肢の骨格では一次骨化中心は認められるものの、骨端部軟骨成長板の肥大化軟骨細胞層における石灰化が貧弱で、この領域への侵入する破骨細胞数も減少していた。Klf4 の軟骨成長板における局在を免疫染色で検討したところ、前肥大軟骨細胞に特に強い局在が認められた。今回の解析から発生初期の骨芽細胞に発現する Klf4 は部位特異的に正常な骨格形成に寄与することが示唆された。また、顎関節や軟骨成長板の正常発生にも寄与していることが判明した。(会員外共同研究者: Amr Ghaleb 博士, Vincent Yang 博士)

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Krüppel-like factor 4 knock out mouse exhibit craniofacial and appendicular skeletal defects

○Fujikawa J^{1,2}, Nomir A¹, Takeuchi Y¹, Kito A^{1,2}, Abe M¹, Wakisaka S¹

¹Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Div Spec Needs Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent

Krüppel-like factor 4 (Klf4) is a zinc finger type of transcription factor which plays important roles during embryonic development. We and others have shown the indispensable roles of Klf4 during osteoblast differentiation and also maturation. However, Klf4 expressed during early stage of skeletogenesis is not completely understood. To further understand the role of Klf4 during this early stage of development, we analyzed the skeletal phenotype of Klf4^{-/-} mice in detail. Postnatal day 0 Klf4^{-/-} mice exhibited multiple craniofacial and appendicular skeletal defects. The width of the mandibular bone was extremely narrowed in the KO mice and ducts of the salivary glands were constricted. Further, the joint cavities of the temporomandibular joint were not observed. Although number of defects were observed in the craniofacial region, tooth morphogenesis appeared normal. In the appendicular skeleton, endochondral ossification was observed; however, mineralization at the terminal hypertrophic layer in the growth plate was quite poor and invasion of the osteoclast in this region was much less compared to the control littermate. Immunohistochemistry revealed that Klf4 was observed in the prehypertrophic layer at the epiphyseal growth plate. These observation indicated that embryonic Klf4 plays important roles for normal skeletogenesis in multiple sites.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-55 間葉系幹細胞におけるクロモグラニン A の発現と役割

○定岡 直¹, 八上 公利², 川原 一郎^{1,2}

¹松歯大 口腔衛生

²松歯大 院歯 健康増進口腔科学

【目的】

生体がストレスを受ける際に副腎髄質をはじめとする内分泌細胞や神経細胞は糖タンパク質であるクロモグラニン A (Chromogranin A:ChgA) を発現する。近年 ChgA が唾液腺から放出されることが示され、ChgA は酸化ストレスの新しい指標として注目されている。実際に、唾液中の ChgA 値は、歯科診療時にストレスを受けた患者で高いことや歯周疾患の重症度と相関する。我々は歯周組織を構成するヒト歯根膜線維芽細胞の ChgA を産生することを本学会の学術大会で報告している。本研究では骨細胞、軟骨細胞への分化能を持つ間葉系幹細胞 (MSC) が ChgA を発現するのかを探ることとした。

【方法】ヒト未分化間葉系細胞 (hMSC) を用いて培養時に化学的な処理を行なった上で、培養液中タンパク質を濃縮・抽出し、Human Chromogranin A EIA kit を用いて ChgA 濃度と ChgA-mRNA 発現量を測定した。

【結果と考察】未分化間葉系細胞が化学的処理により ChgA のタンパク産生量と ChgA-mRNA 発現量が上昇した。ChgA は酸化ストレスにより活性化され細胞傷害性を持つフリーラジカルを産生する iNOS (inducible nitric oxide synthase) の発現亢進に関与するとされる。本研究の結果は ChgA が NF- κ B をコントロールすることで新生骨の形成促進を行う可能性を示唆する。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Expression and role of chromogranin A in mesenchymal stem cells

○Sadaoka S¹, Yagami K², Kawahara I^{1,2}

¹Dept Oral Health, Matsumoto Dent Univ

²Dept Health Promotion Stomatol, Matsumoto Dent Univ Grad Sch Dent

When the living body is subjected to stress, endocrine cells and the nerve cells including the adrenal medulla express chromogranin A (Chromogranin A:ChgA) which is a glycoprotein. We report that we produce ChgA of human periodontal ligament fibers blast cells constituting parodontium in the academic meeting of this society. We decided to investigate whether mesenchymal stem cells (MSC) with a bone cell, the differentiation potency to cartilage cells developed ChgA in this study. Concentration extracted protein in culture medium after having taken a chemical step at culture using hMSC and measured ChgA level and ChgA-mRNA expression level using Human Chromogranin A EIA kit. Protein-producing quantity and ChgA-mRNA expression level of ChgA increased by chemical treatment cells pro-undifferentiated mesenchyma. It is said that ChgA is associated with the expression of iNOS (inducible nitric oxide synthase) sthenia which it is activated by oxidative stress, and produces a free radical with cell cytotoxicity. Because ChgA controls NF- κ B, the results of this study suggest the likelihood that we form it, and is accelerated of the neonatal bone.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-56 骨組織における FGF23 産生細胞の経時的局在変化について

○櫻井 敦中^{1,2}, 長谷川智香², 山本知真也², 佐野 英彦¹, 網塚 憲生²

¹北大 院歯 保存

²北大 院歯 硬組織発生

【目的】 FGF23 は、腎臓の FGF23 受容体 (FGFR1c)/klotho 複合体に結合し、近位尿管でのリン再吸収を調節する。現在のところ、FGF23 産生細胞は骨細胞とされているが、個体成長に応じて同一系の細胞が FGF23 を産生するのか不明な点が多い。そこで我々は、マウスの胎生期、新生期、授乳期、成獣期における骨組織の FGF23 産生細胞を組織化学的に解析した。

【材料と方法】 胎生 18 日齢および生後 1 日齢, 1, 2, 4, 8, 20 週齢の C57BL/6J 雄性マウスをアルデヒド固定し、大腿骨・脛骨をパラフィンに包埋後、H-E 染色, FGF23 免疫染色を行った。また、一部の大腿骨・脛骨および腎臓から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により *fgf23*, *fgfr1c*, *aklotho* の遺伝子発現を解析した。

【結果と考察】 胎生 18 日齢および生後 1 日, 1 週齢マウスの大腿骨では、ごく弱い FGF23 陽性免疫反応が、骨細胞ではなく、主に骨芽細胞に認められた。しかし、生後 2 週齢 (授乳期) マウスでは、骨芽細胞だけでなく骨細胞も FGF23 陽性反応を示すようになり、離乳後、すなわち、生後 4 週齢から成獣期マウスにおいては、骨芽細胞ではなく、骨細胞が FGF23 強陽性反応を示した。大腿骨・脛骨を用いた RT-PCR 法では、*fgf23* 遺伝子発現は生後 1 日齢までは僅かであったが、生後 1 週齢以降では経時的に発現が増加する傾向が認められた。なお、腎臓における *fgfr1c* と *aklotho* 発現は、全ての群において発現量に有意差を示さなかった。以上より、胎生期から授乳期マウスの骨組織では、骨芽細胞が主に FGF23 を産生するが、離乳期後には、次第に、骨細胞が FGF23 産生細胞へと変化すること、また、FGF23 発現量も増加する可能性が推測された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Chronological changes on the localization of FGF23-synthesizing cells in murine bone

○Sakurai A^{1,2}, Hasegawa T², Yamamoto T², Sano H¹, Amizuka N²

¹Dept Restor Dent, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

²Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Introduction: FGF23 regulates Pi reabsorption in proximal renal tubules of the kidney by mediating FGFR1c/klotho complex. In order to demonstrate the localization of FGF23-synthesizing cells during an individual growth, we have examined immunolocalization of FGF23 in murine femora and tibiae.

Materials and Methods: Embryonic day18 (E18), postnatal day 1 (P1), 1-, 2-, 4-, 8-, 20-weeks old mice were fixed with paraformaldehyde solution for immunohistochemistry of FGF23. Total RNAs were extracted from femora, tibiae and kidneys of these mice to evaluate the gene expression of *fgf23*, *fgfr1c* and *klotho* by RT-PCR.

Results and Discussion: A faint FGF23-immunoreactivity was localized mainly in osteoblasts, but not in osteocytes at E18, P1 and 1-week of age. At 2 weeks after birth (during lactation), however, FGF23-immunoreactivity was observable not only in osteoblasts but also some osteocytes. At 4-, 8-, 20-weeks (after weaning), many osteocytes were shown to intensely synthesize FGF23. Although *fgf23* was slightly expressed in bone until P1, it came to be chronologically intense from around 1-week. The expression level of *fgfr1c* and *klotho* did not change in kidneys of all the samples. Summarizing, it seems likely that osteocytes predominantly synthesize FGF23 after weaning, while osteoblasts are FGF23-synthesizing cells before weaning.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-57 スフィンゴリエリン合成酵素 2 siRNA による骨芽細胞の機能発現に及ぼす影響

○吉川 美弘, 堂前 英資, 鎌田 愛子, 池尾 隆
大歯大 生化

【目的】スフィンゴリエリンは細胞膜上に脂質マイクロドメインと呼ばれる特殊なドメインを形成しており, スフィンゴリエリン自体が細胞外刺激複合体の細胞内取込みや放出, 膜受容体シグナル伝達の調節場として機能していることが報告されている。今回, 私たちは役割が明確にされていない骨芽細胞におけるスフィンゴリエリン合成酵素(SMS)2に着目し, SMS2と骨芽細胞の機能発現との関連について検討した。【方法】マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 から SMS2 を siRNA にてノックダウンし培養した。培養 1 週間後, ALP 染色を行った。また, 1 日齢 ddY マウスの頭蓋冠から単離した骨芽細胞から SMS2 を siRNA にてノックダウンした。6 週齢 ddY マウス脛骨より単離した骨髄細胞と 1,25(OH)2D3 刺激下で共培養し, 1 週後 TRAP 染色を行った。また, SMS2 をノックダウンし, 1,25(OH)2D3 で刺激したのち RANKL mRNA 発現を real-time PCR 法にて解析した。同様に RXR α タンパク質発現をウエスタンブロットティング法により解析した。【結果】SMS2 をノックダウンすると骨芽細胞分化誘導による ALP 染色性を有意に減少させた。また, ノックダウンした骨芽細胞と骨髄細胞の共培養による TRAP 染色陽性多核細胞形成が抑制された。さらに, 1,25(OH)2D3 刺激で RANKL mRNA 発現は有意に低下した。一方 RXR α は 1,25(OH)2D3 刺激に関係なく, タンパク質の発現が抑制された。【結論】以上により, SMS2 は骨芽細胞の分化に関与し, RANKL の発現を制御することで, 破骨細胞分化を調節している可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Sphingomyelin synthase 2 siRNA regulates osteoblast functions

○Yoshikawa Y, Domae E, Kamada A, Ikeo T

Dept Biochem, Osaka Dent Univ

Sphingomyelin is a major lipid on the plasma membrane and is enriched in lipid rafts, which are considered microdomains of the plasma membrane that are critical for signal transduction. However, it is unclear whether sphingomyelin synthase 2 (SMS2) is involved in osteoblast function. To examine the effects of sphingomyelin on osteoblast differentiation, we examined the effect of SMS2 siRNA transfection of MC3T3-E1 cells on ALP staining. In addition, to examine the effects of sphingomyelin on osteoclast differentiation, we examined the effect of SMS2 siRNA transfection of primary osteoblasts (POB) and co-cultured with bone marrow cells, on TRAP staining. In POB transfected with SMS2 siRNA we evaluated gene expression using real-time PCR and protein expression using Western blotting, when the cells were cultured in the presence of 10^{-8} M 1,25(OH)2D3. The ALP cell staining area was decreased by SMS2 siRNA transfection. Formation of TRAP-positive multinucleated osteoclasts was significantly suppressed by SMS2 siRNA. In addition, the mRNA expression of the Vitamin D receptor (VDR) target gene receptor RANKL was significantly suppressed by SMS2 siRNA in POB in the presence of 1,25(OH)2D3. These data indicate that SMS2 siRNA affects osteoblast differentiation and osteoclast differentiation through an effect on RANKL expression.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-58 骨芽細胞分化における転写因子 TFEB の関与

○岡元 邦彰, 坂井 詠子, 西下 一久, 筑波 隆幸

長大 院医歯薬 歯科薬理

【目的】

骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化し、骨基質タンパク質を大量に合成し分泌する骨形成を担う主要な細胞である。未分化間葉系細胞から骨芽細胞の分化成熟過程で関与する転写因子群に関しては多くの研究がなされているが、分解に関与する遺伝子群に関してはほとんど明らかにされていない。本研究では、タンパク分解に関与するリソソーム機能を促進する転写因子 Transcription factor EB (TFEB)に着目して、TFEB と骨芽細胞の分化との関係について解析を行った。

【方法】

骨芽細胞様前駆細胞 MC3T3-E1 cell にアスコルビン酸と β グリセロフォスフェートおよび BMP-2 などの分化誘導試薬を添加して、骨芽細胞様細胞へと分化させた。TFEB の生理学的機能を調べるため、同細胞に TFEB の遺伝子ノックダウン実験を行い骨芽細胞の各種分化マーカーの発現を調べた。また、小胞体ストレス因子の関与が示唆されたため、ATF4 や CHOP などの因子について、メッセージとタンパクレベルで解析を行った。

【結果および考察】

骨芽細胞の分化に伴い TFEB の発現上昇認められた。そこで、TFEB 遺伝子を siRNA によってノックダウンしそのタンパク発現を抑制したところ、骨芽細胞分化は阻害され、分化過程においてアルカリホスファターゼやオステオカルシン等の骨芽細胞分化マーカーの発現量の低下が認められた。小胞体ストレス因子における解析によると、TFEB ノックダウン実験では ATF4 と CHOP の発現上昇が認められた。以上の結果より、TFEB は ATF4 と CHOP の発現を制御することにより骨芽細胞の分化成熟に深く関与することが示唆された。

(会員外共同研究者：米嶋枝里香, 吉田教明)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of transcription factor EB (TFEB) during osteoblast differentiation

○Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Tsukuba T

Dept Dent Pharmacol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Purpose

Osteoblasts are derived from mesenchymal stem cells, and produce extracellular bone matrix proteins such as collagen type I, osteocalcin and osteopontin. Their differentiation is highly regulated by several transcription factors such as Runx2, Sp7/osterix, and ATF4. On the other hand, during osteoblast differentiation, osteoblasts display enhanced endocytosis, elevated degradation ability of lysosomes, and increased total number of lysosomes within the cells. The transcription factor EB (TFEB) has identified as a master regulator of lysosomal biogenesis and controls the expression of various lysosome-related proteins, including lysosomal hydrolases, lysosomal membrane proteins and autophagy-related genes. Here we show that TFEB modulates osteoblast differentiation.

Materials and methods

MC3T3-E1 cells were used in this study. TFEB gene knockdown experiments were carried out by using small interfering RNA (siRNA).

Results and Conclusion

The expression levels of TFEB were up-regulated during osteoblast differentiation. TFEB depletion caused markedly reduced osteoblast differentiation as compared with the control cells. By analysis of down-stream effector molecules, TFEB knockdown was found to cause up-regulation of ATF4 and CHOP, both of which are essential factors for osteoblastogenesis. These results suggest that TFEB regulates osteoblast differentiation through ATF4/CHOP-dependent pathway.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-59 補体成分 C1q が骨代謝に与える影響

○青沼 史子¹, 東 泉², 大住 伴子², 細川 隆司¹, 竹内 弘²

¹九歯大 口腔再建リハ

²九歯大 口腔応用薬理

【目的】加齢に伴う骨量減少は、高齢者の QOL やインプラント治療を始めとする歯科治療の予後にも影響する。この骨量減少傾向は、全身のホルモンバランスによって調節される骨代謝の変化が大きく関与する。一方、マウスを用いた研究において血中の補体成分 C1q が加齢に伴って増加すること、C1q は細胞内シグナル経路の一つ Wnt シグナルを活性化し、筋組織の創傷治癒を遅延させることが最近報告された。今回我々は、骨芽細胞や破骨細胞の分化・機能調節にも Wnt シグナルが重要な役割を果たすことに着目し、補体成分 C1q が骨代謝の調節に関与する可能性の有無について検討した。【方法】破骨細胞分化誘導実験は、8~10 週齢の雄性マウス (C57BL6J) の大腿骨及び脛骨より調製した骨髓細胞を用い、10% 牛胎児血清 (FBS) 含有の MEM α に RANKL および M-CSF を添加した培地で 7 日間培養後、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色にて評価した。骨芽細胞分化誘導実験は、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用い、10% FBS 含有の MEM- α に β -グリセロリン酸およびアスコルビン酸を添加した培地で 7 日間培養後、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色にて評価した。それぞれの細胞分化を C1q の存在・非存在下で誘導し、その分化の程度を観察した。破骨細胞分化誘導実験における Wnt シグナル経路の活性化状態は β カテニンタンパク質の蓄積をウェスタンブロット解析にて評価した。【結果】C1q (100 μ g/ml) は骨髓細胞から誘導した破骨細胞の分化を強く抑制し、MC3T3-E1 細胞の分化誘導に伴う ALP 活性を減少させた。また、破骨細胞分化誘導時において Wnt3a や LiCl を添加した時と同様に、C1q を添加して 24 時間後には、Wnt シグナル活性化の指標となる β カテニンタンパク質の蓄積が確認された。以上の結果からマウスにおいて老化に伴い増加する補体成分 C1q が Wnt シグナルを介して骨代謝バランスの変化に関与していることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of complement C1q on bone remodeling

○Aonuma F¹, Higashi S², Ohsumi T², Hosokawa R¹, Takeuchi H²

¹Div Oral Reconstr Rehabil, Kyushu Dent Univ

²Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ

Age-related bone loss is a clinical problem with the treatment of oral implant. Recently, it was reported that the concentration of complement C1q in the mouse serum increases with aging, and the increased C1q delayed wound healing by modulating Wnt signaling. So, we hypothesized that aging-dependent increase of C1q would affect bone remodeling through Wnt signaling. In this study, we examined the effect of C1q on osteoclastic and osteoblastic differentiation in vitro. Bone marrow cells (BMCs) were isolated from the thighbones and the shinbones of 8-10 week-old male mice. Osteoclastic and osteoblastic differentiation was assessed by staining for TRAP activity and ALP activity, respectively. The cells were treated with C1q, Wnt3a, or LiCl, and the cell lysates were subjected to Western blot analysis for accumulation of β catenin to assess canonical Wnt signaling activation. C1q inhibited the differentiation of BMCs to osteoclasts and of MC3T3-E1 to matured osteoblast. C1q-treatment of the BMCs for 24-hours resulted in accumulation of β catenin as similar to the positive controls, Wnt3a and LiCl-treatment. The results suggest that C1q is involved in bone remodeling possibly through Wnt signaling.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-60 Ca²⁺結合タンパク質 Sorcin の骨・軟骨組織での発現解析

○河井まりこ, 大浦 清

大歯大 薬理

脛骨などの長管骨では成長板軟骨が骨成長の鍵を握っているとされる。そして、骨端部成長板における様々な重要因子がこれまで明らかにされてきた。一方、骨端板軟骨において最終分化した軟骨細胞はアポトーシスを経る、あるいはアポトーシスを経ることなく、骨芽細胞へ分化するという相異なる報告があり、未だその運命は明らかではない。今回、われわれは Ca²⁺結合タンパク質 Sorcin に着目した。Sorcin は Ca²⁺結合タンパク質の一種であり、筋細胞、脳細胞あるいは線維芽細胞においてはアポトーシスに関与することが報告されている。しかし、骨組織あるいは軟骨組織ではこれまで詳細な報告がないことから、その発現を成長板軟骨ならびに骨組織において組織化学的に検討した。胎生ならびに生後のマウス骨端部を採取し、パラフィンブロックを作製し、免疫組織学的解析を行った。また、同一切片にてアポトーシスの検出を TUNEL 法にて行った。マウス骨端部骨組織ならびに成長板軟骨組織において、免疫組織学的に Sorcin の発現を認めた。成長板軟骨においては増殖層では細胞質と核ともに発現を認めたが、肥大軟骨層では特に核に強い発現を認めた。一方、TUNEL 法におけるアポトーシス陽性細胞は肥大軟骨層で多く認められた。以上の結果より、Sorcin は骨組織ならびに成長板軟骨において発現を認め、その発現は細胞質から核内へと移行し、アポトーシスなどの細胞運命決定に関与している可能性を示した。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Localization of Sorcin, Ca²⁺ binding protein, in the bone tissues

○Kawai M, Ohura K

Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ

The factor of chondrocytes differentiation and their apoptosis are important for terminal decision for the growth and size of the long bone. Many key factors of chondrocytes differentiation have been studied and known very well. However, the mechanisms underlying the apoptosis accompanying endochondral ossification are still unclear. We focused on the function of Sorcin, is one of Ca²⁺ binding related proteins, in the myocytes or fibroblasts. Sorcin regulates the apoptosis of these cells. But, the role of Sorcin is not yet reported in the bone development. We analyzed the location of Sorcin in the chondrocytes of columned structured growth plates of mice by immunohistological analyses. Finally, we observed apoptotic phenomenon in the chondrocytes of growth plates of mice by TUNEL. In the proliferative zone chondrocytes, Sorcin was observed in the cytoplasm and nuclei, whereas in the hypertrophic zone chondrocytes, very strong Sorcin expression was observed predominantly in the nuclei. On the other hand, the DNA fragmentation is located in the hypertrophic zone chondrocytes. Our data suggest that Sorcin may undergo translocation from the cytoplasm to the nucleus during formation of columned structure in the growth plate and may be involved apoptosis of chondrocytes like as other cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-61 レチノイン酸過剰・欠乏における septoclast の形態変化と増殖抑制のメカニズム

○坂東 康彦, 坂下 英, 崎山 浩司, 天野 修
明海大 歯 解剖

【目的】我々はこれまでに、マウス骨端板骨軟骨境界部で septoclast が表皮型脂肪酸結合タンパク (E-FABP) を特異的に発現し、さらに、レチノイン酸過剰および欠乏状態で、共に septoclast に形態変化と数の減少が引き起こされることを報告してきた。本研究は、レチノイン酸過剰および欠乏状態で septoclast に起こるこれらの変化の機構を免疫組織化学的に調べることを目的とした。

【方法】レチノイン酸過剰マウスは、4 週齢の ddY マウスに 300 mg/kg のレチノイン酸を大豆油に混ぜたものを経口強制投与し作成した。レチノイン酸欠乏マウスは、ddY マウスにビタミン A 欠乏食を離乳後から 9 週齢になるまで摂食させ作成した。これらのマウスから脛骨近位骨端板の凍結組織切片を作製し、E-FABP の免疫組織化学と TUNEL 法の二重染色、E-FABP とレチノイン酸レセプターである RARbeta, cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP) の免疫組織化学的二重染色を行い走査型共焦点レーザー顕微鏡により観察した。抗 E-FABP 抗体は東北大学大和田祐二教授より供与を受けた。【結果】レチノイン酸過剰マウスの E-FABP 陽性 septoclast には、TUNEL 法によるアポトーシス陽性反応とアポトーシス誘導を介する RARbeta の免疫組織化学的局在が確認された。レチノイン酸欠乏マウスの E-FABP 陽性 septoclast には、細胞の分化増殖抑制因子である CD-RAP の免疫組織化学的局在が観察された。【考察】以上の結果により、レチノイン酸過剰状態における septoclast の形態変化と数の減少は、septoclast に RARbeta を介するアポトーシスが誘導されることにより引き起こされ、レチノイン酸欠乏状態における septoclast の形態変化と数の減少は、septoclast における CD-RAP の発現により引き起こされることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Mechanisms inducing morphological changes and growth arrest of septoclasts by excess or deficiency of retinoic acids

○Bando Y, Sakashita H, Sakiyama K, Amano O

Div Anat, Meikai Univ Sch Dent

Objective: We previously reported that exclusive expression of epidermal-type fatty acid-binding protein (E-FABP) in septoclasts at the chondro-osseous junction (COJ) of the epiphyseal plate of mice, furthermore, morphological change and decrease in number of septoclasts were observed in both excess and deficiency of retinoic acid (RA). In this study, we investigated immunohistochemically the mechanisms of these changes on septoclasts. **Methods:** RA-excess ddY mice were given a single oral dose of 300 mg/kg RAs in soybean oil at 4-weeks old, and RA-deficient mice received the vitamin A-free diet from weaning to 9-weeks old. Frozen sections of the epiphyseal plate were obtained from the proximal tibia of these mice. Double immunostainings of E-FABP and TUNEL method, retinoic acid receptor (RAR) beta, and cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP) were performed. Anti-E-FABP antibody was provided by Prof. Yuji Owada, Tohoku University. **Results:** In RA-excess, TUNEL-positive apoptosis or RARbeta-immunoreactivity was detected in septoclasts. In RA-deficiency, CD-RAP which induces cell growth arrest and morphological change was immunolocalized in septoclasts. **Discussion:** These results suggest that morphological changes and decrease in number of septoclasts were induced by apoptosis mediated by RARbeta in RA-excess and CD-RAP expression in RA-deficiency.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-62 抗 RANKL 抗体が若齢マウスの骨に及ぼす影響

○唐川亜希子¹, 井澤 基樹^{1,2}, 清原 秀一^{1,3}, 坂井 信裕¹, 高見 正道¹

¹昭大 歯 歯科薬理

²昭大 歯 小児成育歯

³昭大 歯 インプラント

【目的】骨吸収抑制剤デノスマブは、破骨細胞分化誘導因子である RANKL に特異的に結合する抗ヒト型 RANKL 抗体を成分とする。デノスマブはビスホスホネート製剤と同等以上の高い骨吸収抑制効果を発揮することから、成人の骨粗鬆症や骨転移を有する固形癌の治療に使用されているが、若齢個体に対する作用について詳細は不明である。本研究ではデノスマブと同様の作用を示す抗マウス RANKL 抗体である OYCI (オリエンタル酵母社製) を用いて、抗 RANKL 抗体が若齢マウスの骨に及ぼす影響について解析した。

【方法】生後 1 週齢の雄性マウスに OYCI (2.5 または 5 mg/kg) を腹腔内に単回投与した後、1, 3, 5 週目に脛骨を摘出し、 μ CT で骨の形態を解析した。また破骨細胞に発現する酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) の活性を利用して破骨細胞を染色した。OYCI との比較のためにビスホスホネート製剤であるゾレドロネート (3 mg/kg) も同様の条件で投与・解析した。

【結果】OYCI 投与 1 週間後の脛骨では、海綿骨量の著しい増加と破骨細胞の減少が認められた。一方、ゾレドロネート投与群においても海綿骨の著しい増加が認められたものの、破骨細胞においては OYCI 投与群ほどの減少は認められなかった。OYCI 投与 3 週間以降では、破骨細胞数の回復が認められ、増加した海綿骨が対照群と同レベルに戻っていた。一方、ゾレドロネート投与群では投与 5 週間後においても増加した海綿骨が維持されていた。

【考察】OYCI による海綿骨の増加は、破骨細胞分化の抑制によるものと推察された。しかし、ゾレドロネートの比較結果から、骨に対する作用は可逆的で一過性の作用であることが示唆された。

(非会員共同研究者：昭和大学歯学部 歯科薬理学講座 古賀貴子, 小児成育歯科学講座 佐藤昌史, インプラント歯科学講座 尾関雅彦)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of anti-RANKL antibody on the bone metabolism of young mice

○Karakawa A¹, Isawa M^{1,2}, Kiyohara S^{1,3}, Sakai N¹, Takami M¹

¹Dept Pharmacol, Showa Univ Sch Dent

²Dept Pediatr Dent, Showa Univ Sch Dent

³Dept Implant Dent, Showa Univ Sch Dent

Aim: The effects of denosumab, an anti-resorptive drug that inhibits the osteoclast differentiation factor RANKL and contributes to increase bone volume, are largely unknown in young patients. We analyzed the effects of OYCI, an anti-RANKL antibody equivalent to denosumab, on bone metabolism in young mice.

Materials and Methods: We injected OYCI (Oriental Yeast Co.) at 2.5 or 5 mg/kg in an intraperitoneal manner into 1-week-old male mice. At 1 to 5 weeks after injection, tibial trabecular bone tissues were obtained and analyzed using micro-CT, while bone osteoclasts were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). The results were compared with those of zoledronate (3 mg/kg), a bisphosphonate.

Results: Apparent increases in trabecular bone were observed in mice that received OYCI, while osteoclasts were markedly decreased as compared to zoledronate administration. On the other hand, both OYCI and zoledronate increased trabecular bone volume. After 3 weeks, trabecular bone volume returned to a normal level in the OYCI group, whereas the increase was maintained in the zoledronate group.

Discussion: Our results indicate that OYCI contributes to increase trabecular bone by suppressing osteoclast differentiation. Furthermore, its effects on bone volume were reversible and on bone metabolism were transient as compared to zoledronate.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-63 破骨細胞の欠如がメッケル軟骨の部位特異的消失様式に与える影響

○井上貴一郎

北大 院歯 口腔機能解剖

【目的】メッケル軟骨は部位特異的な消失を示し、前半では破骨細胞による軟骨内骨化様の吸収を示すが、境を接する後半は破骨細胞が関与せず分解酵素により消失する。本研究では、この部位特異性が進化過程で獲得され、組織環境が変化しても基本的な消失様式や範囲に変更が生じないのかを知る目的で、軟骨内骨化に必須な破骨細胞の欠如が、メッケル軟骨消失の部位特異性に与える影響を検討した。【方法】出生直後の *c-fos* 欠損マウスを用い、破骨細胞非存在下でのメッケル軟骨の消失様相について、血管内皮細胞（トマトレクチン、CD31、IV型コラーゲン）、周皮細胞（ α -SMA、PDGFR- β ）、軟骨分解（MMPs、Cathepsin K）、軟骨の状態（II型、X型コラーゲン、トルイジンブルー「TB」）等を免疫組織化学的に光顕および電顕的に検討した。【結果と考察】前半の軟骨内骨化様領域では、トマトレクチン、CD31、IV型コラーゲン陽性の血管内皮細胞および、PDGFR- β 、 α -SMA 陽性周皮細胞の軟骨小腔内への侵入が確認され、同領域で MMP-9,-13、Cathepsin K も認められた。基質は TB でメタクロマジーを起こし、II型、X型コラーゲン陽性を示していた。したがって前半では基本的には軟骨内骨化様式であるが、基質吸収は侵入血管細胞が行っていると考えられる。一方、後半では基質への血管侵入はなく、軟骨基質全体（軟骨膜に強く）に MMP-9,-13、Cathepsin K が発現し、基質は II型コラーゲン陰性、TB によるメタクロマジー陰性を示していた。また血管が侵入する前半部と、血管が侵入せずに消失する後半部の境界位置は、正常マウスと同じ下顎第1臼歯歯胚直下であった。このことから破骨細胞が欠如する環境でも、メッケル軟骨の部位特異的な基本的消失様式や範囲に変更は生じないが、前半では破骨細胞に代わって血管内皮細胞および周皮細胞等からの分解酵素によりメッケル軟骨基質は分解されたと考えられる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The effect of lack of osteoclasts to the site-specific disappearance style of Meckel's cartilage

○Inoue K

Dept Oral Functional Anat, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

How absence of osteoclast, indispensable for endochondral ossification, affects the disappearance of Meckel's cartilage is examined. Immunohistochemical examination of *c-fos* deficient mice immediately after birth, whose objects were vascular endothelial cells (tomatolectin, CD31 and type IV collagen), pericytes (α -SMA and PDGFR- β), enzyme (MMP-9,13, CathepsinK), cartilage matrix (type II, X collagen and toluidine blue "TB"), was conducted, light and electron microscopically. Invasion of the cartilage lacunae by tomatolectin, CD31 and type IV collagen positive vascular endothelial cells and PDGFR- β and α -SMA positive pericytes was observed in endochondral ossification-like area at the anterior half of Meckel's cartilage. Also in the same area, MMPs and CathepsinK were manifest. TB in the matrix undergoes metachromasy and type II and X collagen showed positive in the matrix. Most of the results basically indicated endochondral ossification and resorption of the matrix by the invading vascular cells. In the posterior half, the cartilage disappearance was observed in the same range just as normal mice, which proves that the boundary between the anterior and the posterior was immediately below the mandibular first molar tooth germ. This experiment shows no change in the site-specific style and range of Meckel's cartilage disappearance, in spite of the absence of osteoclast.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-64 破骨細胞分化過程におけるニコランジルの抑制効果

○岩城 太, 天野 均, 大浦 清
大歯大 薬理

ニコランジルは、NO 様作用と ATP 感受性 K チャネル (K_{ATP} チャネル) の開口作用を有するハイブリッド型の狭心症治療薬である。破骨細胞の分化や活性化には、NO や細胞内カルシウムの一過性上昇が深く関わっていることが明らかにされている。本研究は、ニコランジルの薬理作用が、*in vitro* において破骨細胞分化過程における抑制効果を得られるかを検証する目的で行った。ddY マウスの造血幹細胞を用い、実験群にはニコランジル (1-100 μ M) を添加培養した後、ローダミンファロイジン染色および TRAP 染色にて破骨細胞数を計測した。骨吸収窩アッセイでは、von Kossa 染色にて骨吸収面積が比較された。ニコランジルによる破骨細胞抑制の薬理作用を検証するために、破骨細胞形成過程において可溶性グアニリルシクラーゼ阻害剤 (ODQ) と K_{ATP} チャネル開口作用阻害剤 (グリベンクラミド) 添加による阻害回復実験を行った。総破骨細胞形成数の指標となる TRAP 陽性多核細胞数と活性型破骨細胞の指標となる F アクチンリングを有する細胞数は、ともにニコランジル濃度に依存して破骨細胞数は減少した。骨吸収窩アッセイでは骨吸収面積がニコランジルの濃度依存的に減少することを観察した。阻害回復実験では、ODQ とグリベンクラミドの添加によりニコランジルによる破骨細胞形成抑制作用は消失した。本実験結果から、NO 様作用および K_{ATP} チャネル開口作用は、ともに破骨細胞分化を抑制することがわかり、ニコランジルが骨粗鬆症治療薬につながる可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Nicorandil inhibits osteoclast differentiation *in vitro*

○Iwaki F, Amano H, Ohura K
Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ

Nicorandil is a hybrid angina therapeutic agent that has nitric oxide (NO)-like actions and the ability to open ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP} channels). A transient increase in NO and intracellular Ca^{2+} has been demonstrated to be highly involved in the differentiation and activation of osteoclasts. The objective of this study was to verify that the pharmacological effect of nicorandil suppresses the differentiation process of osteoclasts *in vitro*. The number of TRAP-positive multinucleated cells, which is an indicator of the total number of osteoclasts formed, and the number of cells that obtained F-actin rings, which is an indicator of active osteoclasts, both decreased in the presence of nicorandil in a concentration-dependent manner. The osteo assay showed that the bone resorption area was also reduced with nicorandil in a concentration-dependent manner. In the inhibition recovery experiment, the inhibitory effect of nicorandil on osteoclastogenesis was blocked by the addition of a soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor (ODQ) and a K_{ATP} channel-opening inhibitor (glibenclamide). These results suggest that both its NO-like and its K_{ATP} channel opening activity inhibit osteoclast differentiation. Further study of nicorandil may lead to the development of drugs for osteoporosis treatment.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-65 破骨細胞形成過程における細胞融合と細胞質分裂の形態学的解析

○張 旌旗¹, 白鳥 卓麻^{1,2}, 久木田明子³, 山座 孝義¹, 久木田敏夫¹

¹九大 院歯 分子口腔解剖

²九大 院歯 インプラント

³佐賀大 医 微生物

【目的】破骨細胞は造血幹細胞に由来する前駆細胞が特異的に認識・融合することによって形成される多核細胞である。RANKL 下流のシグナル伝達機構についてはよく報告されていたが、前駆細胞同士の融合または細胞質分裂の形態学所見についての報告が少ない。今回、我々は光顕および走査電顕を用いて前駆細胞間の融合過程を観察し、詳細な形態学的解析を行った。【方法】破骨前駆細胞株である RAW-D 細胞を RANKL および TNF- α で刺激し、培養破骨前駆細胞を TRAP 染色および膜タンパクの免疫標識を行い、細胞の形態学変化をライブイメージング、光顕および走査電顕で解析した。【結果と考察】破骨前駆細胞は形態学特徴および細胞核の数から小型、中型、大型の3種類に分類することができた。培養2日後大量な多核細胞を形成し、TRAP 染色では陽性反応を示した。ライブイメージングおよび走査電顕の観察では単核前駆細胞同士間、また単核前駆細胞と破骨細胞および破骨細胞同士の間に細胞の融合が観察された。一部の多核細胞が細胞質分裂をしていることが観察された。また、2個の前駆細胞間の融合のみならず、複数の前駆細胞同士の同期した融合を示唆する所見も観察された。細胞は大きくなると共に核数も増え、成熟な破骨細胞となった。破骨細胞は必要に応じて細胞質分裂により複数の破骨細胞になる可能性が示唆された。生物機械的要因や骨吸収能の変化に応じて破骨細胞自身は動的に形態を変化させることにより骨吸収能が調節する可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Ultrastructural study of the cell fusion and cytokinesis during osteoclasts formation

○Zhang JQ¹, Shiratori T^{1,2}, Kukita A³, Yamaza T¹, Kukita T¹

¹Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Sect Implant Rehabil Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent

³Dept Microbiol, Saga Univ Fac Med

Purpose: Osteoclasts are the multinucleated giant cells formed by the cell fusion of mononuclear osteoclast precursors. The downstream signal transduction of RANKL concerning the osteoclast differentiation is well understood, but the morphology of cell-cell fusion is less known. Here we investigated the osteoclastogenesis of RAW-D cell to describe the details in cell fusion. **Methods:** The live-cell imaging was adopted to observe the whole process of multinuclear osteoclast formation. The tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining and scanning electron microscopy (SEM) were applied to identify the osteoclasts. **Results:** After 2-days of culture, a large number of pre-osteoclasts were observed. We classified the osteoclasts into the small, medium, and large types of osteoclasts according to the cell size. Through live-cell imaging and SEM, we found the cell fusion was generated by the fusion among mononuclear precursors (POC), the fusion between POC and osteoclasts, and the fusion between multinucleated osteoclasts. Time-lapse studies showed the diverse shapes of osteoclast fusion, in which the cytokineses of large osteoclasts were also observed. **Conclusion:** Osteoclasts can form giant multinucleated cells via cell fusion. On the other hand, it also can decrease the cell volume and nucleus number via cytokinesis, possibly to adapt the requirement of bone resorption modulation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-66 ファイブロネクチン N 末端断片は破骨細胞前駆細胞の CD13 に結合して破骨細胞形成を促進させる

○天野 滋, 大森 喜弘

明海大 歯 口腔生物再生医工

歯周疾患における破骨細胞性骨吸収や関節リウマチ性骨破壊は、骨形成を上回る成熟破骨細胞の数の増加と機能亢進によると考えられている。破骨細胞分化・細胞融合・機能発現に関する報告は多いが、破骨細胞前駆細胞の増殖や機能維持に関する報告は少ない。私共が樹立した破骨細胞前駆細胞株 4B12 細胞は、その細胞維持にマウス胎児頭蓋冠由来間葉系細胞の培養上清が必要不可欠であることを報告した。私共は、M-CSF, Insulin-2, Nidogen-2, IGFBP-2 そして Fibronectin N 末端断片が破骨細胞前駆細胞機能維持因子であることを同定、報告した。IGFBP-2^{-/-}骨髄細胞から成熟破骨細胞への分化誘導が減弱したという報告はこれらの結果の一つと一致する。興味あることに IGFBP-2 と Fibronectin N 末端断片 30kDa (Fn30kDa) との間に相同性の高いアミノ酸配列領域を検出した。目的は、破骨細胞形成における Fn30kDa の役割を明らかにすることである。Fn30kDa は破骨細胞前駆細胞上で発現している CD13 に結合し、RANK, TRAF6, NFATc1, c-Fos 発現を上昇させ、そして破骨細胞形成を促進した。Fn30kDa の腹腔内投与は、末梢血中の CD13/Mac-1 陽性細胞数を増加させ、LPS 誘導性頭蓋冠骨吸収を促進した。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The N-terminal fragment of Fibronect binds to CD13 of osteoclast progenitor and enhances osteoclastogenesis

○Amano S, Ohmori Y

Dept Oral Biol Tissue Eng, Meikai Univ Sch Dent

It is assumed that bone destruction in periodontal disease and rheumatoid arthritis is due to an imbalance in bone remodeling that favors bone resorption by osteoclasts. The role of osteoclast regulatory factors for osteoclast differentiation and function has been extensively studied, however little is known about factors required for maintenance and proliferation of osteoclast precursor. We have reported that calvaria-derived stromal cell conditioned media is essential for maintaining for osteoclast precursor cell line, 4B12. Recently we have identified that M-CSF, Insulin-2, Nidogen-2, IGFBP-2 and N-terminal fragment of Fibronectin are maintenance factors. One of these results is consistent with the report that osteoclast differentiation from *Igfbp2^{-/-}* bone marrow cells into mature osteoclasts was impaired. Interestingly, we found the amino acid consensus sequence shared between IGFBP2 and the N-terminal fragment 30-kDa of fibronectin (Fn30k). The aim is to elucidate the role of Fn30k in osteoclastogenesis. Fn30k bound to CD13 expressed on osteoclast precursors, increased the expression of RANK, TRAF6, NFATc1 and c-Fos, and enhanced osteoclastogenesis. Intraperitoneal injection of Fn30k in mice increased the number of CD13/Mac-1 positive cells in peripheral blood, and enhanced calvarial bone resorption induced by LPS.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-67 Keap1 遺伝子欠損は Irf8 の発現上昇を介して破骨細胞分化を抑制する

○坂井 詠子, 福岡 裕, 西下 一久, 岡元 邦彰, 筑波 隆幸

長大 院医歯薬 歯科薬理

【背景と目的】 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) は、抗酸化酵素群の発現を制御する転写因子である Nuclear factor E2 p45-related factor 2 (Nrf2) に結合する細胞質タンパクである。酸化ストレス下では、Keap1 のシステイン残基が酸化されると Nrf2 は分解から免れ、核への移行が促進され第 2 相抗酸化酵素遺伝子の発現を促進する。我々はこれまでに Keap1 遺伝子欠損によって破骨細胞分化が顕著に抑制されることを見出した。本研究では、Keap1 を介した破骨細胞分化抑制の分子メカニズムを明らかにする目的で行った。

【方法】 破骨細胞分化を野生型、Keap1 遺伝子欠損マウス、および Nrf2 遺伝子欠損マウスを用いて比較した。TRAP 染色、リアルタイム PCR、ウェスタンブロットティングを行った。

【結果と考察】 Keap1 遺伝子欠損では TRAP 陽性多核破骨細胞の顕著な形成阻害が認められたが、Nrf2 遺伝子欠損では破骨細胞形成の亢進が認められた。また活性酸素種検出試薬を用いて、フローサイトメトリーにより解析したところ、細胞内酸化ストレスレベルは Keap1 遺伝子欠損が最も低く、Nrf2 遺伝子欠損では最も高い酸化ストレスレベルであった。破骨細胞分化に重要な転写因子である NFATc1 のタンパク発現が Keap1 遺伝子欠損では顕著な減少が認められ、逆に Nrf2 遺伝子欠損では NFATc1 のタンパク発現の上昇が認められた。さらに Keap1 遺伝子欠損では、NFATc1 の発現を負に制御する転写因子 Irf8 の発現が顕著に増加しており、Nrf2 遺伝子欠損では逆に抑制されていた。これらの結果より、破骨細胞分化において Keap1/Nrf2 を介した酸化ストレスレベルが Irf8 と NFATc1 の発現に作用し、破骨細胞分化を制御している可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) gene deletion inhibits osteoclast differentiation via up-regulation of interferon regulatory factor-8 (Irf8)

○Sakai E, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T

Dept Dent Pharmacol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Background and purpose: Keap1 is a cytoplasmic protein that binds to Nrf2, a master transcription factor of anti-oxidative stress enzymes. Upon exposure to oxidative stress, oxidation of Keap1 cysteine residues inhibits Nrf2 degradation, stimulates Nrf2 nuclear translocation and induces the expression of phase II antioxidant enzymes. Our recent studies have demonstrated that deletion of Keap1 gene significantly inhibits osteoclastogenesis. This study investigated the molecular mechanisms of Keap1-mediated suppression of osteoclastogenesis.

Methods: Osteoclast differentiation was evaluated using wild-type, Keap1-knockout, and Nrf2-knockout mice. TRAP-staining, QPCR, and western blot analysis were performed.

Results and discussions: Formation of TRAP-positive multinucleated osteoclasts was suppressed in Keap1-knockout cells, while that was increased in Nrf2-knockout cells. Flow cytometric analysis with ROS indicator revealed that the lowest levels of ROS were observed in Keap1-knockout cells, while the highest levels of ROS were observed in Nrf2-knockout cells. Protein expression of NFATc1 was downregulated in Keap1-knockout cells, while that was upregulated in Nrf2-knockout cells. Gene expression of Irf8 which is a negative regulator of NFATc1 was significantly up-regulated in Keap1-knockout cells, while that was down-regulated in Nrf2-knockout cells. These results suggest that the Keap1/Nrf2-mediated oxidative stress level has crucial roles in osteoclastogenesis affecting the expression of Irf8 and NFATc1.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-68 オスミウム浸軟法による破骨細胞のゴルジ装置の立体微細構造および分布に関する走査型電子顕微鏡観察

○山本 恒之, 坪井香奈子, 長谷川智香, 本郷 裕美, 網塚 憲生

北大 院歯 硬組織発生

【目的】破骨細胞のゴルジ装置は核周囲に発達し、リソソーム形成や膜の形成・分配を行っている。ゴルジ装置は破骨細胞にとって重要な細胞小器官であるものの、形態に関する所見は切片観察から得られたものがほとんどであり、立体形態については不明な点が多い。我々は破骨細胞のゴルジ装置を透過型電子顕微鏡およびオスミウム浸軟法を用いて走査型電子顕微鏡により観察し、その立体微細構造および核周囲における立体分布について検索した。

【材料と方法】8週齢雄性ラットをアルデヒド系固定液で灌流固定し、大腿骨遠位端と脛骨近位端を摘出した。一部は矢状方向に凍結切断し、Tanaka と Mitsushima (1984) の方法に従い0.1%オスミウム溶液で20℃、10-12日間浸軟処理を施し走査型電顕用試料とした。他はEDTA脱灰後、通法に従い透過型電顕用試料とした。大腿骨、脛骨ともに骨端板に直接する一次骨梁を観察部位とした。

【結果と考察】核周囲のゴルジ装置は数層のゴルジ層板からなり、核側の形成面を構成する層板は10-50nm径の小孔が等間隔で並ぶ規則的な網目構造を呈し、核から遠ざかるにつれて小孔が消失し板状の層板となった。核膜と形成面との間には小胞や管状構造物が認められた。ゴルジ装置は不定形の孔を持ちながらも核を広範囲にわたり包み込むように分布していた。以上の所見から、破骨細胞のゴルジ装置は連結し一体化することで核全体を籠状に取り囲み、膜成分やリソソーム酵素を含む蛋白質の一部を核膜から受け入れていることが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Three-dimensional structure and distribution of Golgi complexes in osteoclasts observed by scanning electron microscopy using an osmium-maceration method

○Yamamoto T, Tsuboi K, Hasegawa T, Hongo H, Amizuka N

Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Introduction

Osteoclasts have highly-developed Golgi complexes around nuclei. This study was designed to elucidate the three-dimensional structure and distribution of Golgi complexes in osteoclasts.

Materials & Methods

Eight-week-old Wistar rats were used. After perfusion fixation, distal end of femora and proximal end of tibiae were dissected out. For scanning electron microscopy, some specimens were sagittally freeze-cracked, and then macerated with 0.1% OsO₄ according to Tanaka and Mitsushima (1984). Other specimens were demineralized and processed for transmission electron microscopy. Primary trabeculae adjacent to the growth plate were examined in both femora and tibiae.

Results & Discussion

Each Golgi complex consisted of 4-5 stacks of cisterns around nuclei. The cis-most cistern facing the nucleus formed meshwork with regularly-arranged small pores. As the distance from the nucleus increased, the cisterns reduced pore numbers and the trans-most cistern showed more plate-like configuration. There were vesicles and tubular structures between the cis-most cistern and nuclear membrane. Regarding the three-dimensional distribution, Golgi complexes covered a wide area of the nucleus. In conclusion, it is suggested that Golgi complexes are linked together around the nucleus and receive membranous elements and several kinds of proteins including lysosomal enzymes from the nuclear membrane.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-69 Pam₃CSK₄による RANK/RANKL 非依存性の破骨細胞形成とマウス頭蓋冠骨吸収作用について

○鈴木 恵子^{1,2}, 有本 隆文³, 長岡 正博¹, 桑田 啓貴³, 篠田 壽⁴

¹奥羽大 歯 歯科薬理

²昭大 歯 歯科薬理

³昭大 歯 口腔微生物

⁴東北大 院歯 環境歯学研セ

【目的】 歯周病での歯槽骨吸収は、本来ならば細菌感染から宿主を防御するための炎症反応を原因とする組織損傷である。Pam₃CSK₄は合成トリアシルリポペプチドであり、細胞膜上の Toll-like receptor (TLR) 2 を介して生理活性を示すことが知られている。本研究では、Pam₃CSK₄の培養破骨細胞形成能および *in vivo* でのマウス頭蓋冠骨吸収作用について LPS と比較することで、病的骨吸収におけるグラム陽性菌の関与について検討した。【方法】 RAW 264.7 細胞またはマウス骨髓細胞からマクロファージ及び間葉系細胞を除去して調製した破骨前駆細胞を RANKL 非存在下で Pam₃CSK₄ または TLR4 の特異的リガンドである LPS (Re mutant) と共に培養し破骨細胞形成能および遺伝子発現を定量した。さらに、マウス頭頂部皮下に Pam₃CSK₄ または LPS (Re mutant) を投与後、麻酔下 *in vivo* X-ray CT により骨吸収程度を経時的に観察した。【結果と考察】 Pam₃CSK₄ は RANKL 非依存性に破骨細胞を誘導し、分化マーカーの遺伝子発現を促進した。この作用は LPS (Re mutant) ではみられなかった。マウス頭頂部皮下に Pam₃CSK₄ を投与すると数時間以内に炎症が起き、5 日以内に TLR2 依存的に頭蓋冠骨吸収像が観察された。以上の結果から、グラム陽性菌細胞壁と類似の構造をもち TLR2 を介して作用する Pam₃CSK₄ によって RANKL 非依存的に破骨細胞形成が起きること、さらにマウス頭蓋冠に炎症性骨破壊が生じることが明らかになり、グラム陽性菌が歯周病での歯槽骨破壊に関与する可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Pam₃CSK₄, a tri-acylated lipopeptide, induces osteoclastogenesis RANK/RANKL-independently and resorbs calvarial bone *in vivo* through Toll-like receptor 2

○Suzuki K^{1,2}, Arimoto T³, Nagaoka M¹, Kuwata H³, Shinoda H⁴

¹Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent

²Dept Pharmacol, Showa Univ Sch Dent

³Dept Oral Microbiol Immunol, Showa Univ Sch Dent

⁴Ctr for Environ Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Oral microorganisms are a common cause of periodontitis, in which accelerated alveolar bone resorption by osteoclasts may ultimately lead to tooth loss. To study the involvement of lipopeptide, a component of Gram-positive bacteria, in the pathogenesis of periodontitis-associated inflammatory osteolysis; we investigated whether Pam₃CSK₄, a synthetic tri-acylated lipopeptide, influenced the activation of osteoclasts and induced calvarial osteolysis *in vivo* in mice. Pam₃CSK₄ stimulated osteoclastogenesis at all the concentrations examined (between 0.01 and 1 μg/ml) both in RAW 264.7 cells and preosteoclasts, prepared from bone marrow cells by removing macrophages and stromal cells, without adding RANKL exogenously; whereas 1 μg/ml LPS (Re mutant; isolated and purified from Minnesota R595), a ligand for TLR4, did not. Moreover, local injection of Pam₃CSK₄ (0.4 mg/mouse) onto the skull of wild-type mice induced inflammatory osteolysis, which was detected by *in vivo* X-ray CT within 5 days of injection, whereas no inflammation or bone resorption occurred in TLR2-/- mice, indicating that bone resorption *in vivo* also occurred through a TLR2-dependent mechanism. These findings demonstrate an important role of tri-acylated lipopeptide in differentiation and activation of osteoclasts which results in pathological bone destruction through TLR2 ligation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-70 破骨細胞における CCN2 結合性アクチン骨格制御因子 CD302 の作用機序の解明

○青山絵理子¹, 久保田 聡^{1,2}, 滝川 正春¹

¹岡大 院医歯薬 歯先端研セ

²岡大 院医歯薬 口腔生化

骨, 軟骨組織の増殖, 分化に関与するさまざまな生理活性因子の中でも CCN2 はその多機能性と作用機構の特殊性でよく知られている. この因子は他の様々な因子と結合してそれらの機能を制御することにより多機能性を発揮するものと考えられている. そこでその結合因子を見いだすことで新たな機能を解明できると考え, 結合因子のスクリーニングを行ったところ, C タイプレクチンドメインを有する膜タンパク質の一種である CD302 を見いだした. 我々は昨年の本大会でマウス由来骨髓細胞から誘導した破骨細胞に CD302 が発現しており, その CD302 と CCN2 およびアクチンが結合することを示した. また, CD302 の発現を抑制することにより破骨細胞のアクチンリングの形成および骨吸収が強く阻害されることも併せて発表した. 今回の発表では CD302 のこの作用の機序について検討した結果を示す. まず, CD302 の発現を抑制することによって細胞死が誘導されるために分化が抑制される可能性を検討したが, 対照群と CD302 発現抑制群とでアポトーシス細胞の出現頻度に違いは見られなかった. さらに, 破骨細胞に特異的に発現する因子の遺伝子発現も CD302 の発現抑制により阻害されることはなかった. これらのことから CD302 は直接的にアクチンリングの形成に関与している可能性が高まった. 近年, CD302 と同じく C タイプレクチンドメインをもつ dectin-1 が hem ITAM を介して SHP-2 と結合していることが報告されたことから, CD302 と SHP-2 の結合を調べたところ両者が結合することが明らかになった. CCN2 は SHP-2 の活性化を促進することが報告されていることから, 今回の結果と併せて CD302 は SHP-2 を介して直接的にアクチンリング形成に必須の役割を果たしており, CD302 と CCN2 との結合がこの経路を促進している可能性が考えられる.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Mechanism of action of CCN2-binding protein CD302 on osteoclast maturation

○Aoyama E¹, Kubota S^{1,2}, Takigawa M¹

¹Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci (ARCOCS), Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

²Dept Biochem Mol Dent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

CCN2 is known as a multi-functional factor in proliferation and differentiation of mesenchymal tissues and cells, of which function is produced via its direct bindings to other growth factors or membrane proteins. As a result of screening, CD302/DCL-1 was found as a new candidate binding to CCN2. CD302 is one of the C-type lectin receptors, but the distribution and the function are mostly not clarified. Previously we presented that CD302 was expressed on osteoclasts induced from murine bone marrow cells. Also, inhibition of CD302 expression caused fragmentation of actin ring in mature osteoclasts and reduced bone resorption *in vitro*. Here, we investigated the mechanism underlying how CD302 contributed to osteoclast maturation. As a result, inhibition of CD302 expression disturbed neither cell surviving nor gene expressions of key factors in osteoclast maturation. These data suggest that CD302 directly regulates actin ring formation in mature osteoclasts. Next we explored intracellular signaling pathway of CD302 and found the binding of SHP-2 to CD302. SHP-2 was reported to bind to hem ITAM region, and CD302 also has hem ITAM region. Taken together, these findings show that CD302 together with CCN2 directly influences actin ring formation through SHP-2 activation via the ITAM region.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-71 TAK-1 阻害による腫瘍進展の抑制と骨病変の改善効果

○寺町 順平, 岡村 裕彦, 羽地 達次

徳大 院医歯薬 口腔組織

【背景・目的】我々はこれまでに骨髄腫(MM)細胞と骨髄微小環境との相互作用により両者に Pim-2 キナーゼが発現誘導され、腫瘍進展と骨病変の形成に重要なシグナルを媒介していることを報告したが、最近 Pim-2 の発現誘導に関わる因子として TAK-1 を見出した。そこで、今回 TAK-1 の MM 腫瘍進展や骨破壊における役割を明らかにするため以下の検討を行った。【方法・結果】1) TAK-1 は MM 細胞株において恒常的に高発現していた。また、TAK-1 阻害薬 LLZ1640-2 は TNF- α による NF- κ B, p38MAPK, ERK の活性化や IL-6 による STAT3 の活性化を抑制し、MM 細胞に直接的な細胞死を誘導した。また、LLZ1640-2 は骨髄間質細胞の VCAM-1 の発現を抑制し、MM 細胞との接着と骨髄間質細胞の MM 増殖促進活性を抑制した。2) MM 細胞培養上清(MMCM)や MM における骨芽細胞分化抑制因子として報告されている IL-3, IL-7, TNF- α , TGF- β や activin A はいずれも単離骨髄間質細胞および前骨芽細胞株 MC3T3-E1 に TAK-1 の発現およびそのリン酸化を誘導した。LLZ1640-2 は、TNF- α および TGF- β シグナルを抑制し、MMCM により抑制された MC3T3-E1 の石灰化結節の形成を回復した。3) 破骨細胞分化に伴い TAK-1 の発現は上昇した。さらに、LLZ1640-2 は MMCM および sRANKL による前破骨細胞株 RAW264.7 の NFATc1 や c-fos の発現亢進と破骨細胞形成誘導を抑制した。4) LLZ1640-2 は脛骨内移植によるマウス骨髄腫モデルにおいて腫瘍の著明な縮小効果と骨病変改善効果を示した。【まとめ・考察】TAK-1 は MM の腫瘍進展と骨破壊病変形成を促進する極めて重要な制御因子であり、TAK-1 阻害薬は腫瘍抑制とともに骨病変の進行防止と骨再生をもたらす新規治療薬の候補と考えられる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Tumor reduction and bone restoration by TAK-1 inhibition

○Teramachi J, Okamura H, Haneji T

Dept Histol Oral Histol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

Multiple myeloma (MM) has a unique propensity to develop and expand almost exclusively in the bone marrow and generate destructive bone disease. We have reported that Pim-2 is overexpressed in MM cells and their surrounding cells in bone lesions, and that treatment with Pim inhibitors markedly suppressed MM tumor growth and bone destruction. We recently found TGF- β -activated kinase-1 (TAK-1) as an upstream mediator responsible for Pim-2 up-regulation. We therefore extended our study to clarify the role of TAK-1 in tumor growth and bone destruction in MM. TAK-1 was constitutively over-expressed and phosphorylated in MM cells. The TAK-1 inhibitor LLZ1640-2 (LLZ) dose-dependently suppressed MM cell growth, and induced apoptosis. Phosphorylation of TAK-1 was also induced in bone marrow stromal cells by inhibitors of osteoblastogenesis in MM as well as MM cell conditioned media. However, LLZ restored osteoblastogenesis in the presence of these inhibitory factors. Furthermore, LLZ suppressed osteoclastogenesis by RANK ligand. Finally, treatment with LLZ potently suppressed MM growth in MM mouse models. Taken together, these results suggest that TAK-1 plays a pivotal role in MM tumor growth and bone destruction, and that TAK-1 may become an efficacious therapeutic target in MM.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-72 酵素補充遺伝子治療を行った致死性低ホスファターゼ症モデルマウスの顎骨および歯に対する効果の解析

○池上 良¹, 高橋 有希², 佐藤 亨¹, 笠原 正貴², 村松 敬³

¹東歯大 クラウン補綴

²東歯大 薬理

³東歯大 保存

低ホスファターゼ症(HPP)は組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNALP)遺伝子の変異により生じる先天性疾患で、骨形成不全や乳歯の早期脱落などを主徴とする。病型は致死性のものから軽症の歯限局型のものまで存在する。近年、酵素補充療法の有効性が認められ、2015年には、本邦にて治療薬が製造・販売された。しかし、酵素補充療法で治療効果を得るためには長期反復投与が必要となり、侵襲性が高い。また、延命効果に関しては報告されているが、顎骨や歯の治療効果に対する検討は不明な点が多い。そこで本研究ではHPPモデルマウスに8型アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによる酵素補充を行った場合の顎骨および歯の治療効果を形態学的に評価した。

出生後1日齢のHPPモデルマウスに骨親和型TNALP発現AAVベクターを筋肉注射(治療群)し、90日後に下顎骨の解析を行った。動物実験用マイクロCTを用いて、画像撮影および距離計測(下顎骨全長、歯槽骨長径、下顎第一臼歯の全長と歯根長)を行った。また、下顎骨の脱灰パラフィン切片を作製し、HE染色像を観察した。コントロールとして、同日齢のC57BL/6野生型マウス(WT群)を用いた。下顎骨のマイクロCT解析では、治療群において切歯の石灰化不全と臼歯の歯根露出が認められ、距離計測値は有意に低値となった($P < 0.05$, $n = 5$)。組織学的解析では歯槽骨頂レベルの低下や、無細胞セメント質の欠如が認められた。以上の結果から、延命効果や行動量の改善が得られるものの、硬組織の完治には不十分であり、延命効果が得られる血中アルカリホスファターゼ濃度と硬組織の治療不全の改善が認められる血中濃度とに差がある可能性が考えられた。今後、硬組織を治療するために必要となる酵素量、ベクター投与方法の検討および安全性の確認を行う予定である。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The elucidation of mandibular bone and tooth in severe infantile hypophosphatasia model mouse treated by gene therapy

○Ikeue R¹, Takahashi A², Sato T¹, Kasahara M², Muramatsu T³

¹Dept Crown Bridge Prosthodont, Tokyo Dent Coll

²Dept Pharmacol, Tokyo Dent Coll

³Dept Endodont Pulp Periapical Biol, Tokyo Dent Coll

Hypophosphatasia (HPP) is caused by deficiency of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNALP). To cure HPP, the clinical benefits of enzyme replacement therapy (ERT) were suggested, but it requires repeated administration of the enzyme. Although prolonged survival is reported, the therapeutic effects on the dentoalveolar tissues were unknown. In this study, we evaluated the dentoalveolar tissues of the lethal TNALP knockout (HPP) mice after administration of the recombinant adeno-associated virus (AAV) vector. We constructed the AAV vector expressing bone-targeted TNALP, and injected the AAV vector into the muscle of the newborn HPP mice. At day 90, we measured morphometric value of the mandibular bone and teeth by micro CT. Next, we performed histologic staining of decalcified mandibular bone sections. Micro CT analysis showed reduction of mineralization and root exposure in the teeth and shortened morphometric value at the treated mice. Histological analysis showed that the alveolar bone crest and partial defect of cementum at the treated mice. The results suggest that bone-targeted TNALP did not cure defect of the dentoalveolar tissues at this dose of the vector. Currently, we are planning to determine the minimum dose of TNALP to cure the hard tissue by using improved transfection strategies with codon-optimized transgene cassette.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-73 ビタミンC欠乏の塩味及び酸味物質に対する鼓索神経応答への影響

○安尾 敏明, 諏訪部 武, 山村 知暉, 裕 哲崇

朝日大 歯 口腔生理

ビタミンは、体内で十分な量を生合成できないため、毎日摂取しなければならない、もしそうしなければ、欠乏症が生じる。ビタミンC（以下、VC）が欠乏すると壊血病が起きることが広く知られている。しかしながら、VC欠乏の末梢味覚器への影響については、いまだ明らかにされていない。これまでに我々は、VC欠乏ラットでは、VC水溶液、塩酸や食塩水に対する鼓索神経応答が低下している可能性を示してきた。塩味応答は阻害剤アミロライドによって部分的に抑制されることから、少なくともアミロライド感受性受容機構とアミロライド非感受性受容機構の2種類の経路が存在することが報告されている。そこで、本研究では、これらの経路にVC欠乏が影響しているのかどうかを明らかにするために、VC欠乏ラットと非欠乏ラットにおけるアミロライドを用いた塩味の鼓索神経応答解析を行った。また、いくつかの有機酸に対する応答についても同様の解析を行った。その結果、高濃度のNaClの応答において、VC欠乏ラットでは非欠乏ラットと比べて、アミロライド非感受性受容機構応答成分には有意な変化が無いが、アミロライド感受性受容機構応答成分が有意に減少していることが明らかとなった。また、クエン酸、酢酸及び酒石酸に対する応答の減少も観察され、塩酸やVCだけでなく、多くの酸応答が減少していることが明らかとなった。以上の結果から、VC欠乏は、末梢味覚器において、塩味のうち、アミロライド感受性受容機構の経路や有機酸の受容機構経路に影響を与える可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The effect of vitamin C deficiency on the chorda tympani nerve responses to salt and sour tastants

○Yasuo T, Suwabe T, Yamamura T, Sako N

Dept Oral Physiol, Asahi Univ Sch Dent

Vitamins cannot be synthesized in sufficient quantities by an organism, and must be supplied by the daily ingestion otherwise deficiency may occur. The lack of vitamin C (VC) lead to the medical syndrome called Scurvy. However, the effect of VC deficiency on peripheral taste organ is unclear. In the previous report, we presented that the magnitudes of whole chorda tympani nerve (CTN) responses to VC, HCl, NaCl in VC deficient rats were significantly smaller than those in non-deficient rats. In this study, CTN recording was carried out to evaluate the amiloride-sensitive NaCl responses and amiloride-insensitive NaCl responses and some other organic acid responses in the VC deficient and non-deficient rats. Amiloride-sensitive NaCl responses in VC deficient rats were significantly decreased. On the other hand, there was no significant difference in the amiloride-insensitive NaCl responses between VC deficient and non-deficient rats. The magnitudes of the CTN responses to citric acid, acetic acid and tartaric acid in the VC deficient rats were significantly smaller than those in the non-deficient rats. These data suggest that amiloride-sensitive component may be changed in VC deficient rats. The VC deficiency may have a decreasing effect on the amiloride-sensitive NaCl and organic acid responses in rats.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-74 マウス味細胞における glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor (GIPR) の発現

○高井 信吾¹, ニノ宮裕三², 重村 憲徳¹

¹九大 院歯 口腔機能解析

²九大 味覚嗅覚センサ研究開発セ 感覚生理

近年、味受容体は舌上だけでなく、膵臓や腸管といった様々な臓器に発現し、腸管吸収上皮における糖輸送体の発現量の調節や、インスリン、インクレチンといった消化管ホルモンの分泌調節に関わっていることが示唆されている。逆に、消化管で発見されたホルモンやレセプターが末梢味覚器にも発現しているという報告が相次いで為されているが、詳細な分布や機能に関しては未だ多くが解明されていない。昨年、我々は、下部腸管から分泌されるインクレチンホルモンの一つである glucagon like peptide-1 (GLP-1) が末梢味覚器において、甘味情報の伝達に関わっていることを示した。本研究では、同じくインクレチンホルモンの一種であり、上部腸管から分泌されることが知られている glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor (GIP) とそのレセプター (GIPR) のマウス味蕾における発現を検証した。今回行った RT-PCR 実験では、GIP の mRNA はマウス味覚器から検出されなかった。また、免疫組織化学的手法の結果、舌前方部茸状乳頭味蕾、後方部有郭乳頭味蕾ともに、GIPR 発現味細胞の約 7 割は甘味受容体サブセット T1R3 を共発現していた。一方酸味受容に関わる味細胞のマーカー GAD67 発現味細胞には GIPR はほとんど見られなかった。以上のことから、血中に存在する GIP は、甘味受容に何らかの影響を与えている可能性が示唆される。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The expression of glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor (GIPR) in mouse taste tissue

○Takai S¹, Ninomiya Y², Shigemura N¹

¹Sect Oral Neurosci, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Div Sensory Physiol, R&D Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu Univ

Recent studies revealed that taste receptors are expressed not only in oral cavity, but also on many organs, such as intestine and pancreas, and they are suggested to be involved in the secretion of insulin or other gut peptides. On the other hand, the hormones and their receptors which were originally identified in gut, are shown to be expressed in peripheral taste tissue, but their functions are still largely unclear. Our group reported that one insulintropic hormone called glucagon like peptide-1 (GLP-1) may function as a sweet-specific taste transmitter in mouse peripheral taste system. In this study, we look at the expression of the other insulintropic peptide called glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) and its receptor (GIPR) in mouse taste tissue. According to the results from immunohistochemical experiments, GIPR was mainly coexpressed with T1R3 (a subset of sweet taste receptor) in both anterior and posterior part of tongue. However almost no GIPR expression was observed in GAD67, a marker of sour sensitive taste cells, immunopositive cells. On the other hand, GIP mRNA was not detected in RT-PCR experiments. Thus it is possible that GIP come from blood circulation and its signals may have some effect sweet taste perception.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-75 酢酸誘発口内炎モデルラットにおける疼痛関連因子の変化

○人見 涼露, 小野堅太郎, 野代 知孝, 伊藤 美紗, 稲永 清敏
九歯大 生理

不適合義歯や矯正装置の使用, 口腔がん治療の副作用などにより口内炎が発症するが, 多くの場合, その痛みにより食事や会話が妨げられる。しかし, 口内炎疼痛の発生機序については不明な点が多い。本研究では, 行動評価法と分子生物学的解析法を用いて, 口内炎モデルラットにおける疼痛関連因子と遺伝子変化について検討した。50%酢酸を下顎歯槽粘膜に30秒間作用させることで口内炎モデルを作製した。疼痛評価として, 覚醒下にてラビング時間(自発痛の指標)および下顎歯槽粘膜の機械逃避閾値(機械的アロディニアの指標)を測定した。口内炎部位の細菌コロニー数および, ELISA法にてプロスタグランジン E₂(PGE₂)量を解析した。さらに, 酢酸処理2日目のラットより摘出した三叉神経節のマイクロレイ解析, 機能分類解析(Gene ontology解析)および定量性RT-PCRを行った。酢酸処理1日目では, 粘膜部の軽度の発赤と腫脹がみられるものの, 疼痛は認められなかった。しかし, 2日目においては, 潰瘍を伴う明らかな口内炎が発症し, 自発痛と機械的アロディニアが認められた。また, 2日目以降において口内炎部組織中の細菌コロニー数およびPGE₂量が増加したことから, 口内炎疼痛の発症には細菌感染性炎症が関与している可能性が示唆された。さらに, 酢酸処理2日目の三叉神経節において, “defense response(防御応答)”, “response to wounding(創傷応答)”および“inflammatory response(炎症応答)”に関与する遺伝子が増強した。そのうち, 上位3つの *Hamp* (hepcidin antimicrobial peptide), *Reg3b* (regenerating islet-derived 3B)および *Serpina3n* (serine peptidase inhibitor A3N)のmRNA量は, 抗菌薬投与により抑制された。以上より, 酢酸処理による口腔粘膜上皮の破壊が感染性炎症を引き起こし疼痛を伴う潰瘍性口内炎を発症すること, 同時に, 感覚ニューロンにおいて抗菌作用を持つ遺伝子発現が増強される可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Pain-associated mediators and gene modulation in acetic acid-induced oral ulcerative mucositis in rats

○Hitomi S, Ono K, Nodai T, Ito M, Inenaga K

Div Physiol, Kyushu Dent Univ

Oral ulcerative mucositis induces severe pain, which leads to difficulty eating and speaking. To reveal the molecular mechanisms underlying oral ulcerative mucositis-induced pain, we investigated putative pain-associated mediators, pain-related behaviors and gene modulation in a rat oral mucositis model. On day 1 after acetic acid treatment, the mucosal area showed slight redness and swelling but no evidence of ulceration or pain induction. On day 2, oral ulcers were obvious, as was the induction of spontaneous and mechanical pain. In the treated mucosal area, bacterial loading and prostaglandin E₂ increased beginning on day 2; no significant changes were observed on day 1. DNA microarray analysis of trigeminal ganglion tissue collected on day 2 identified 32 significantly regulated genes (>1.5-fold change in expression). The up-regulation of the top 3 genes, *Hamp* (hepcidin antimicrobial peptide), *Reg3b* (regenerating islet-derived 3B) and *Serpina3n* (serine peptidase inhibitor A3N), was validated through quantitative RT-PCR. This up-regulation was also suppressed by systemic pre-treatment with antibiotic and pain-relieving drugs. Therefore, we conclude that the oral ulcerative mucositis-induced pain is caused by infectious inflammation of the ulcerative area and stimulates anti-bacterial and anti-peptidase gene expression in sensory neurons.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-76 喉頭領域を支配する上喉頭神経における TRPV1 および TRPM8 チャネルの発現

○安藤 宏¹, 増田 裕次², 北川 純一³

¹松歯大 生物

²松歯大 院歯 顎口腔機能制御

³松歯大 口腔生理

【目的】 飲食物を飲み込む時の感覚は、「のどごし」や「嚥下の誘発」に重要であるが、どの感覚モダリティ（種類）が重要であるのかは明らかになっていない。これらの感覚には、温度やカプサイシン、メントール等に応答する Transient receptor potential (TRP)チャネルが関与していることが考えられる。本研究では、喉頭領域の感覚を支配する上喉頭神経の細胞体が存在する下神経節において、43℃以上の温度および唐辛子の成分（カプサイシン）や酸によって活性化する TRPV1 チャネルと冷刺激やメントール刺激に応答する TRPM8 チャネルの発現分布を免疫組織学的方法により調べた。【方法】 SD ラットを用い、喉頭領域を支配する感覚神経が含まれる迷走神経の上喉頭神経末梢部位に逆光性トレーサーフルオロゴールド (FG) を注入した。2~3 日後ホルマリン還流固定し、神経節を摘出してクリオスタットで凍結切片を作成した。1 次抗体として、ギニアピッグおよびウサギポリ抗 TRPV1 抗体、ウサギポリ抗 TRPM8 抗体を用いた。有髄神経のマーカーとしてマウスモノ抗ニューロフィラメント 200 (NF200) 抗体を用いた。蛍光二重染色法により TRP チャネル等の免疫局在を観察した。【結果と考察】 FG が注入された感覚神経の細胞体は下神経節内において顕著な局在性が見られず、神経節全体に広く観察された。同神経節において、多数の TRPV1 および TRPM8 の免疫陽性細胞体が観察された。これらの免疫陽性細胞のうち約半分程度で TRPV1 と TRPM8 の共存が見られた。TRPV1 免疫陽性細胞体のうち有髄神経のマーカーである NF200 との共存が見られたのはわずかであった。同様に TRPM8 免疫陽性細胞でも NF200 との共存が見られたのはわずかであった。以上より無髄神経線維に発現している TRPV1 および TRPM8 が「のどごし」や「嚥下誘発」に関与している可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Expression of TRPV1 and TRPM8 channels in the superior laryngeal nerve innervating the laryngeal region

○Ando H¹, Masuda Y², Kitagawa J³

¹Dept Biol, Matsumoto Dent Univ

²Dept Oral Maxillofac Biol, Matsumoto Dent Univ Grad Sch

³Dept Oral Physiol, Matsumoto Dent Univ

The primary afferent nerves innervating the laryngeal region show strange responses to chemical stimulations, differ from the responses of the taste nerves innervating the tongue. It is possible that transient receptor potential (TRP) channels are involved in these characteristic responses to chemical stimulations in the laryngeal region. In the present study, we immunohistochemically investigated the expression of TRPV1 channel which detect temperature (>43°C), is activated by capsaicin and acids, and TRPM8 channel which is able to detect cold temperature and is activated by menthol in the nodose ganglion (NG) containing the cell bodies of the superior laryngeal nerve (SLN) innervating the laryngeal region. The cell bodies stained by a neuronal retrograde tracer Fluoro-gold (FG) were observed scattered all over in the NG following the FG-injection to the laryngeal region. TRPV1-immunoreactive (IR) and TRPM8-IR cell bodies were abundantly observed in the NG. Approximately half of the cells among TRPM8-IR cells showed TRPV1-immunoreactivity. In addition, scarcely TRPV1 and TRPM8-IR cells were expressed in myelinated neurons of the SLN. These results suggest that TRPV1 and TRPM8 channel in non-myelinated nerve of the SLN have play significant roles in regulating food palatability and in controlling food intake.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-77 マウス鼓索神経・舌咽神経における SGLT1 を介する甘味情報

○安松 啓子^{1,2}, 岩田 周介^{2,3}, 大栗 弾宏², 重村 憲徳², ニノ宮裕三^{1,3}

¹九大 味覚嗅覚センサ研究開発セ・感覚生理

²九大 院歯 口腔機能解析

³Monell Chemical Senses Center

【目的】 T1r3 欠損マウスの残存糖応答が観察されて以来, T1rs 以外に糖類を検出するメカニズムがある可能性が示唆されてきた. 近年報告された味覚器に発現する糖センサー候補の中で, sodium-glucose cotransporter (SGLT) 1 は小腸上皮細胞におけるグルコース吸収だけでなく, 腸内分泌細胞におけるセンサーの役割も果たしていることが示唆されている. そこで本研究は, マウスの鼓索神経および舌咽神経の糖応答を詳細に解析し, 舌の味覚器における SGLT1 の機能を調べた. 【方法】 動物は C57BL/6J マウスを用い, 鼓索神経と舌咽神経における全神経線維束応答を記録した. 試験溶液は, sucrose, グルコース, sorbitol, SC45647 など様々な甘味物質と KCl, キニーネ硫酸塩, monopotassium glutamate (MPG), クエン酸と, それらの 10 mM NaCl 混合液を用いた. また, 鼓索神経の甘味に最も高いインパルス頻度を示す単一神経線維についても, 上記の甘味物質における NaCl 添加の効果を解析した. 【結果と考察】 全神経線維束応答では鼓索神経と舌咽神経両方において, sucrose, グルコース, sorbitol に 10 mM の NaCl を添加した時に有意な増強が見られ, その増強は SGLTs の抑制剤 phloridzin によって消失した. 一方 KCl, MPG, クエン酸, キニーネ硫酸塩, SC45647, polycose については NaCl 添加による増強は見られなかった. 記録した鼓索神経の単一神経のうち, 甘味応答神経の一部が NaCl 添加による増強を示し, その効果は phloridzin によって消失した. これらの結果から, SGLT1 が糖, 糖アルコールの味覚と NaCl 添加による増強を引き起こし, 甘味応答神経によりそれらの情報が脳に送られる可能性が示唆された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Sweet taste information via SGLT1 in mouse chorda tympani and glossopharyngeal nerves

○Yasumatsu K^{1,2}, Iwata S^{2,3}, Ohkuri T², Shigemura N², Ninomiya Y^{1,3}

¹Div Sensory Physiol, R&D Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu Univ

²Sect Oral Neurosci, Kyushu Univ Grad Sch Dent

³Monell Chemical Senses Center

Several studies indicated that there are T1r-independent mechanisms for detecting sugars. Recently, plausible candidates of sugar sensors for this mechanisms were reported to express mouse gustatory tissues. Among them, a sodium-glucose cotransporter (SGLT) 1 was shown to fulfil a role as an intestinal sensor in enteroendocrine cells in addition to mediation of glucose absorption in intestinal epithelial cells. In the present study, we investigated the function of SGLT1 as sweet taste receptor in taste tissues by examining nerve responses to sugars, sugar alcohols, artificial sweeteners, amino acids with and without NaCl in the chorda tympani (CT) and the glossopharyngeal (GL) nerves of C57BL/6J mice. Significant enhancement of responses were observed in responses to sucrose, glucose, and sorbitol when added 10 mM NaCl to the solutions but not in responses to KCl, MPG, citric acid, quinine sulfate, SC45647, and polycose in both CT and GL nerves. These enhancement were abolished by lingual application of phloridzin, a competitive inhibitor of SGLTs. In single fiber recording, a subset of fibers best responded to sucrose showed significant reduction of impulse frequencies by lingual application of phloridzin. These results suggest that sweet taste and its enhancement by addition of NaCl occur via SGLT1.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-78 食品の嗜好性の違いが咀嚼時の筋活動と咀嚼運動前後の自律神経・脳活動に与える影響

○本間 志保^{1,2}, 脇坂 聡¹

¹阪大 院歯 口腔解剖 1

²梅花女子大 看護保健 口腔保健

摂食行動は咀嚼・嚥下・消化運動から成り立つもので生活の質（QOL）を保つために非常に重要な要素である。食品の性状や味、風味（フレーバー）が摂食行動に影響を与えるという研究がなされてきたが、匂いの嗜好性が摂食行動やそこから生じる自律神経活動や脳の認知行動に及ぼす影響についてはまだ不明な点が多い。本研究では摂取した食品の嗜好性の違いによって心電図の心拍変動解析から自律神経系の活動を、閉口筋・開口筋の筋電図から咀嚼パターンの変化を、さらに脳波測定により脳神経活動の変化について、それぞれ明らかにすることにより、咀嚼運動と神経活動の関連性について検索を行った。実験は大阪大学大学院歯学研究科・歯学部及び歯学部附属病院倫理審査委員会の承認を受け、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して行った。本研究の結果より嗜好性の違いが神経系に及ぼす影響にはいくつかのパターンが認められた。比較的多く認められたのは、好ましくない食品を摂取した時と比較すると好ましい食品を摂取した場合には、食品咀嚼後の安静時に副交感神経の活動が優位となる状態であった。自律神経系の活動は必ずしも咀嚼パターンと関連づけられるわけではないが、好ましい食品を摂取した場合には好ましくない食品摂取の場合よりも、咀嚼筋活動は増強される傾向が認められた。しかし好みの与える影響の個人差はかなり大きく、神経活動の変化やそれと咀嚼運動パターンとの関連性はいくつかのパターンが観察された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

ECG, EMG and EEG analysis of the effect of food preference on masticatory muscle activity and neural activity during mastication period

○Honma S^{1,2}, Wakisaka S¹

¹Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Dept Oral Health Sci, BAIKA Women's Univ

Ingestion behavior, which is comprised of chewing, swallowing and digestion, is an important factor controlling quality of life. Many studies showed that the characteristics of foods, such as texture, taste and flavor, affect the ingestion behavior. A little is known, however, on the effects of preference of flavor on the ingestion behavior and neuronal activity. In this study, we examine the effects of preference of flavor on ingestion behavior by monitoring the autonomic nerve activity by electrocardiogram (ECG), masticatory muscle movements by the surface electromyogram (EMG) and evaluation of cognitive activity by the electroencephalogram (EEG) in adult human healthy subjects by injection the favorable an unfavorable food. The experiments are approved by the Ethics Committee of the Osaka University Graduate School of Dentistry. Several types of nervous activities and chewing pattern were observed. In many cases, a parasympathetic system was dominant when the subjects take unfavorable flavor, compared to the favorable one. However, individual variation effected to the neuronal activities and the chewing pattern. The autonomic nerve activity pattern did not necessarily accord with a chewing pattern though, masticatory muscles activity tend to increase when the favorable food was taken.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-79 末梢神経損傷後の脊髄後角ニューロンの興奮性における時間空間的变化

○寺山 隆司¹, 山本 裕也^{1,2}, 岸本 宜子^{1,2}, 田畑 光康^{1,2}, 丸濱功太郎¹, 飯田 征二²,
杉本 朋貞¹

¹岡大 院医歯薬 口腔機能解剖

²岡大 院医歯薬 顎口腔再建外科

末梢神経損傷後の脊髄後角でニューロンの過剰な興奮とグリア細胞の活性化が起こり、これらの変化が神経障害性疼痛の発症や持続に関与していることが示されてきている。本研究では末梢神経損傷後の脊髄後角におけるニューロンの興奮性の変化およびグリア細胞の活性化について損傷を受けた神経が投射する部位とその周囲でどのように起こるのかを明らかにすることを目的とした。そのためにラット第5腰椎神経結紮後の各時間経過において後肢への侵害熱刺激によって誘発されるc-Fos陽性ニューロンの分布を第4~6腰椎後角において検討した。また神経損傷後の各時間経過でミクログリアとアストロサイトの細胞マーカーであるOX-42とGFAPの免疫染色を行った。その結果、第4腰椎後角では神経損傷後3日で侵害熱刺激によって誘発されるc-Fos陽性ニューロン数が有意に増加したが、7日以降ではsham手術群と同様のレベルの誘発となった。一方、第5腰椎後角では損傷後3日でc-Fos陽性ニューロン数は有意に減少したが、14日および21日で多くの陽性ニューロンが認められた。グリア細胞マーカーの免疫染色ではOX-42が神経損傷後3日、GFAPが神経損傷後7~14日をピークに損傷を受けた神経の投射部位で染色性の亢進が認められた。これらの結果は末梢神経損傷によって脊髄後角ニューロンの興奮性の変化およびグリア細胞の活性化が損傷を受けた神経の投射部位に関連してそれぞれ異なる様式で起こることを示すものであり、これらの変化が神経障害性疼痛の病態に関わっている可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Spatiotemporal changes in neuronal excitability in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury

○Terayama R¹, Yamamoto Y^{1,2}, Kishimoto N^{1,2}, Tabata M^{1,2}, Maruhama K¹, Iida S²,
Sugimoto T¹

¹Dept Oral Funct Anat, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

²Dept Oral Maxillofac Reconstr Surg, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

The aim of this study was to examine neuronal excitability and glial activation in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury. We examined noxious heat stimulation-induced c-Fos protein-like immunoreactivity (Fos-LI) neurons in fourth-to-sixth lumbar (L4-L6) level spinal dorsal horn neurons after fifth lumbar spinal nerve ligation (L5 SNL). Immunofluorescence labeling of OX-42 and GFAP was also performed in histological sections of the spinal cord. A significant increase in the number of Fos-LI neurons in the spinal dorsal horn at the L4 level was found at 3 days after SNL, but returned to a level similar to that in sham-operated controls by 14 days after injury. In contrast, a decrease in the number of Fos-LI neurons in the spinal dorsal horn at the L5 level was found at 3 days after SNL, but had reappeared in large numbers by 14 and 21 days after injury. Immunofluorescence labeling of OX-42 and GFAP indicated sequential activation of microglia and astrocytes in the spinal dorsal horn. We conclude that nerve injury causes changes in neuronal excitability and glial activation in the spinal dorsal horn. These changes may play a substantial role in the pathogenesis of neuropathic pain after peripheral nerve injury.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-80 持続性の顎関節炎が両側性の咬筋に痛覚過敏を引き起こす中枢メカニズム

○岡本圭一郎¹, 黒瀬 雅之¹, 中谷 暢佑^{1,2}, 長谷川真奈^{1,3}, 藤井 規孝³, 高木 律夫², 山村 健介¹

¹新潟大 院医歯 口腔生理

²新潟大 院医歯 顎顔面口外

³新潟大 医歯病院 歯総診

持続性の顎関節 (TMJ) 炎が咬筋部の侵害受容に及ぼす影響を咬筋ホルマリン刺激による疼痛関連行動および三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) での pERK の発現を指標に検討した。雄性ラットの TMJ への CFA 注入による炎症モデルを作製し、生食注入 (非炎症) 群と比較した。疼痛関連行動はホルマリン刺激後に発生する顔面部の前肢による Rubbing, Grooming 行動時間を計測し、1 相 (0~6 分), 2 相 (9~45 分) に区分し検討した。行動時間は TMJ 炎症側で Day 2~14 で増加した。一方、反対側咬筋刺激による行動時間は Day 10~14 日で増加が見られた。pERK 陽性細胞は TMJ 炎症群 (Day 14), 非炎症群を用い、ホルマリン注入後の pERK の発現変化を (0, 3, 10, 20, 60 分) を検討した。pERK 陽性細胞数はホルマリン刺激側の Vc 部/Laminae I-II で見られた。陽性細胞数は非炎症、炎症群いずれにおいても咬筋刺激後 (TMJ 炎症側), 10 分後にピークに達したが、観察時間中、陽性細胞数は炎症群が非炎症群より有意に多かった。一方、TMJ 炎症の反対側ホルマリン刺激群では、10 分で pERK 陽性細胞数がピークを示し、以後、減少を認め、さらに 3~10 分の時点での陽性細胞数は非炎症群より増加していた。以上の結果より、持続性の顎関節炎は両側性に咬筋の痛覚過敏を引き起こすが、その発現は時間依存性であった。そしてその脳神経基盤として Vc 部での ERK 活性の増大が関与する可能性が明らかとなった。本研究結果は、持続性の顎関節痛が中枢神経系に変調をもたらすことを示唆する。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Bilateral increases in ERK activation at spinomedullary junction region by masseter muscle injury during temporomandibular joint inflammation in the rats

○Okamoto K¹, Kurose M¹, Nakatani Y^{1,2}, Hasegawa M^{1,3}, Fujii N³, Takagi R², Yamamura K¹

¹Div Oral Physiol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Div Oral Maxillofac Surg, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

³Gen Dent Clinic Edu Unit, Niigata Univ Med Dent Hosp

We determined the contribution of persistent monoarthritis of temporomandibular joint region (TMJ) to bilateral masseter muscle (MM) nociception in the male rats using orofacial nocifensive behaviors and immunohistochemistry for pERK expression at the medullary dorsal horn (Vc) region in response to formalin injection into the MM region. TMJ inflammation was induced by CFA injection into the left TMJ. The orofacial nocifensive behaviors evoked by formalin injection ipsilateral or contralateral to TMJ inflammation were increased at 2 to 14 days or at 10 and 14 days after TMJ inflammation, respectively. The number of pERK positive cells by MM stimulation was investigated at superficial laminae in the Vc at 3, 10, 20 and 60 min at 14 days after TMJ inflammation. TMJ inflamed rats displayed greater responses of pERK expression at Vc region by ipsilateral MM stimulation at 3-60 min, while contralateral MM stimulation increased pERK response at 3 and 10 min in comparison to non-CFA rats. These findings demonstrated that unilateral monoarthritis of TMJ region enhanced MM nociceptive responses bilaterally with increases in pERK responses at Vc region in time course dependent manner.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-81 ラット扁桃体連続電気刺激により誘発されるリズム的な顎運動

○佐藤 義英, 石塚 健一, 高橋 睦, 岩崎 信一

日歯大新潟 生理

【目的】我々はラットにおいて、扁桃体中心核の medial division, lateral division と capsular part のうちの部位がリズム的な顎運動を誘発させるのに有効か調べた。そしてリズム的な顎運動の特性を解析した。またウサギやネコにおいては、扁桃体外側核の連続電気刺激によりリズム的な顎運動が誘発されることが知られている。そこでラットでも扁桃体外側核の連続電気刺激によってリズム的な顎運動が誘発されるかどうか検索した。【方法】ラットは、ウレタンで麻酔した。扁桃体中心核または扁桃体外側核の連続電気刺激（持続時間 0.2 ミリ秒, 30 ヘルツ, 10 秒）を行い、下顎の垂直運動と水平運動を記録した。また顎二腹筋前腹と咬筋から筋電図を記録した。実験終了後、組織学的に刺激部位を確認した。【結果と考察】リズム的な顎運動は、扁桃体中心核の medial division と lateral division の刺激によって誘発された。顎運動は常に開口運動が先行し、単純な開閉運動から成るリズム的な運動が続いた。リズム的な顎運動の頻度は 3-5 Hz だった。垂直運動は小さく、水平運動は非常に小さかった。咬筋の筋電図活動は閉口相では見られず、顎二腹筋前腹の筋電図活動は開口相で群発発射を示した。またリズム的な顎運動は、扁桃体中心核の capsular part または扁桃体外側核の刺激によって誘発されなかった。これらの結果から、扁桃体中心核の medial division と lateral division がリズム的な顎運動の制御に関与していることが示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Rhythmic jaw movements induced by repetitive electrical stimulation of the amygdaloid nucleus in the rat

○Satoh Y, Ishizuka K, Takahashi M, Iwasaki S

Dept Physiol, Nippon Dent Univ at Niigata

In rats, we examined which part of the central amygdaloid nucleus (Ce) is effective in inducing rhythmic jaw movements; we analysed those movements; and we investigated whether rhythmic jaw movements are induced by repetitive electrical stimulation of the lateral amygdaloid nucleus (La). The rats were anesthetized with urethane. Repetitive electrical stimulation (0.2 ms duration, 30 Hz, 10 s) was applied to the Ce or the La. The electromyograms were recorded from the anterior belly of the digastric muscle (dEMG) and masseter muscle (mEMG). Rhythmic jaw movements were induced by stimulation of the medial (CeM) and lateral (CeL) divisions of the Ce. These movements always began with opening of the jaw, and were followed by rhythmic movements which consisted of simple opening-closing movements. The frequency of rhythmic jaw movements was 3-5 Hz. Vertical movement was small and horizontal movement was very small. There was no activity in the mEMG during the jaw-closing phase. Activity in the dEMG showed bursts during the jaw-opening phase. Rhythmic jaw movements were not induced by stimulation of the capsular part of the Ce or the La. These results indicate that the CeM and the CeL are involved in the control of rhythmic jaw movements.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-82 オレキシン A は GLP-1 の嚥下反射減弱作用を相殺する

○小橋 基, 藤田 雅子, 美藤 純弘, 松尾 龍二

岡大 院医歯薬 口腔生理

我々は以前 glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が延髄背側部を介して、上喉頭神経刺激により惹起した嚥下反射を抑制することを報告した。GLP-1 は摂食を抑制する作用をもつが、摂食を亢進する作用を持つオレキシン A やグレリンも同様に嚥下反射を修飾することを明らかにしてきた。そこで今回我々は、摂食に対して GLP-1 とは逆の作用をもつオレキシン A が GLP-1 の嚥下反射に及ぼす抑制的作用にどのように関与するかを知るために、ウレタン・クロラロース麻酔下ラットを用いて実験を行った。上喉頭神経中枢端を双極プラチナ・イリジウム線電極を用い電気刺激 (20 Hz, 20 秒間) することにより嚥下反射を惹起した。舌骨上筋群に刺入した双極釣針電極から導出した筋電図および目視により嚥下運動を同定した。上喉頭神経刺激期間に惹起された嚥下数を、嚥下頻度として記録した。刺激開始時点から初回嚥下の筋電図波形のピークまでの時間を、初回嚥下潜時として記録した。オレキシン A あるいはオレキシン 1 受容体拮抗薬の前投与により、GLP-1 を孤束核内束核に微量注入した際の嚥下反射抑制の度合いがどのように変化するかを観察した。オレキシン A の第四脳室内前投与により、GLP-1 による嚥下反射の抑制度合いが少なくなった。一方、オレキシン 1 受容体アンタゴニストの第四脳室内前投与により、GLP-1 による嚥下反射の抑制度合いは大きくなった。オレキシン 1 受容体アンタゴニストの孤束核の正中部への微量注入でも同様の作用がみられた。オレキシン A と GLP-1 の作用部位が近接はしているが異なっていることから、延髄背側部の神経回路を介してオレキシン A 受容ニューロンが、GLP-1 受容ニューロンを抑制していることが示唆された。本研究は JSPS 科研費 15K00818 の助成を受けたものです。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Orexin-A counterbalances the inhibition of reflex swallowing induced by GLP-1

○Kobashi M, Fujita M, Mitoh Y, Matsuo R

Dept Oral Physiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

We examined the relationship between orexin-A and GLP-1 on the regulation of reflex swallowing in anaesthetized rats. Swallowing was elicited by repeated electrical stimulation of the superior laryngeal nerve (SLN) and was identified by the electromyogram of the mylohyoid muscle. The injection of GLP-1 (20 pmol) into the medial nucleus of the solitary tract (mNTS) decreased the frequency of swallowing during the SLN-stimulation. The latency of the first swallowing tended to be extended after the administration of GLP-1. Fourth ventricular administration of orexin-A prior to the injection of GLP-1 attenuated the degree of suppression of the swallowing response induced by GLP-1-administration. The injection of small dose of GLP-1 (6 pmol) into the mNTS did not affect the reflex swallowing. The injection of small dose of GLP-1 induced the suppressive response of the reflex swallowing after the pre-administration of orexin-1 receptor antagonist into the fourth ventricle. After the microinjection of SB334867 into the commissural part of NTS (cNTS), the injection of small dose of GLP-1 also induced the suppressive response. These results revealed that the orexin-A suppresses GLP-1-response of the reflex swallowing by way of orexin-1 receptors situated in the cNTS. This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number 15K00818.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-83 発達期ラット三叉神経運動ニューロンへのグルタミン酸性シナプス入力

○中村 史朗, 中山希世美, 望月 文子, 清本 聖文, 井上 富雄

昭大 歯 口腔生理

【目的】摂食行動は、発育に伴い吸啜から咀嚼へと大きく転換する。この転換期には、顎運動を制御する中枢神経機構もまた変化すると考えられるがその詳細は明らかではない。そこで本研究では、幼若期ラット三叉神経運動ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行い、AMPA型およびNMDA型グルタミン酸受容体を介した興奮性微小シナプス後電流（mEPSC）の生後発育変化を解析した。【方法】実験には生後2～5, 9～12, 14～17日齢のWistar系ラットを用いた。麻酔下にて脳幹スライス標本を作成後、tetrodotoxin (1 μM), SR95531 (10 μM) およびstrychnine (10 μM) 存在下で咬筋運動ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行った。AMPA型mEPSCは膜電位を-60 mVに保持した状態で、NMDA型mEPSCは膜電位を+40 mVに保持した状態かつAPV (10 μM) 投与下でそれぞれ記録した。【結果】AMPA型mEPSCの振幅と発生頻度は、生後発育に伴い増加する傾向にあったが各日齢群で有意差はみられなかった。mEPSCの減衰時間は、生後9～12日齢および14～17日齢のほうが2～5日齢よりも有意に低い値を示した ($P < 0.01$)。一方、NMDA型mEPSCの振幅と発生頻度は、2～5日齢のほうが14～17日齢よりも有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。【考察】以上の結果から、ラット咬筋運動ニューロンへの興奮性シナプス入力の性質が生後発育とともに変化すること、またグルタミン酸受容体の種類によって発達様式が異なることが示された。このような咬筋運動ニューロンへの興奮性シナプス入力の発育変化は吸啜から咀嚼の転換に関与する可能性が考えられる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Glutamatergic synaptic inputs to the rat developing trigeminal motoneurons

○Nakamura S, Nakayama K, Mochizuki A, Kiyomoto M, Inoue T

Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent

Feeding behavior of mammals greatly changes from suckling to chewing during early postnatal ages. It is possible that the central neural circuits responsible for jaw movement change during this period. However, the details of these changes of the neural circuits are still unclear. In this study, we examined the developmental changes of AMPA and NMDA receptor-mediated miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) in the rat trigeminal motoneurons during the early postnatal period. The experiments were performed with brainstem slices from P2-5, 9-12 and 14-17 Wistar rats. Whole-cell recordings were made from masseter motoneurons. After bath applications of strychnine, SR95531 and tetrodotoxin, AMPA receptor- or NMDA receptor-mediated mEPSCs were observed at a holding potential of -60 or +40 mV, respectively. There were no significant differences in the amplitude and frequency of the AMPA components between three age groups, whereas those of NMDA components were significantly larger at P2-5 than at P14-17 motoneurons ($P < 0.05$). These results demonstrate the characteristics of mEPSCs in masseter motoneurons changes during early postnatal periods. It is possible that such postnatal development of the glutamatergic synaptic inputs to the masseter motoneurons contributes to the transition from suckling to mastication.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-84 無髄神経欠損モデルラットにおける島皮質局所回路の変化

○村山 翔太^{1,2}, 小林 真之²

¹日大 歯 保存 II

²日大 歯 薬理

口腔内の侵害情報は末梢の自由神経終末で受容され、一次求心性線維である有髄の A δ 線維と無髄の C 線維を介して三叉神経脊髄路核に存在する二次ニューロンへ投射する。しかし、A δ と C 線維が高次脳で処理される機構、例えば各々投射する領域が異なるか否かについては不明であり、この点にアプローチするには、A δ と C 線維いずれかを欠損させたモデルが極めて有用である。我々は、生後 1-2 日齢の Wistar 系ラットの頸部に capsaicin (CAP, 100 mg/kg) を皮下投与し、TRP チャンネルが発現する無髄神経を部分的に欠損したラットを作製し、口腔感覚を受容する島皮質でのシナプス伝達の変化を調べた。CAP 投与 20-25 日後に CAP 処置群および sham 群のラットから急性脳スライス標本を作製した。なお三叉神経節の CGRP 発現を免疫組織化学的手法により定量化することで、TRP チャンネル発現線維の欠損度を評価した。顆粒島皮質ならびに不全顆粒島皮質 II/III 層に存在するニューロンからホールセル・パッチクランプ記録を行い、脱分極性パルスに対する発火特性から興奮性ニューロン (Pyr) および GABA 作動性 fast-spiking ニューロン (FSN) を同定した。その後 TTX (1 μ M) ならびに CNQX (20 μ M) の灌流投与し、miniature IPSC (mIPSC) を記録した。Sham 群と比較して、CAP 処置群の Pyr では mIPSC の振幅の減少がみられたが、FSN から記録される mIPSC に振幅の変化は認められなかった。一方、Pyr および FSN ともに、mIPSC の発生頻度に有意な差は認められなかった。以上の結果は、CAP 処置による無髄神経の脱落によって、島皮質 Pyr に対する抑制性入力が増弱することが明らかになった。この結果は、一次求心性無髄神経の入力の減少が脳皮質の神経回路を再編させる可能性を示唆する。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Changes of insular cortical local circuits in the model rats that receive ablation of unmyelinated primary sensory fibers by capsaicin injection

○Murayama S^{1,2}, Kobayashi M²

¹Dept Endodont, Nihon Univ Sch Dent

²Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent

Nociceptive signals are conveyed from the peripheral free nerve endings to the secondary sensory neurons in the spinal trigeminal nucleus via myelinated A δ and unmyelinated C fibers. However, the mechanisms how these signals are processed in cerebral cortex remain unknown. The model rat whose unmyelinated C fibers are partially ablated by capsaicin injection is quite useful to approach this issue. Here, we applied capsaicin (CAP, 100 mg/kg) to Wistar rats (postnatal days 1-2) to ablate unmyelinated primary sensory fibers. We performed whole-cell patch-clamp recording from layers II/III pyramidal (Pyr) and fast-spiking (FS) neurons in the insular cortical slice preparation obtained 20-25 days after CAP treatment. The effectiveness of the CAP treatment was confirmed by immunohistochemistry of CGRP in the trigeminal ganglion. Miniature IPSCs (mIPSCs) were recorded under application of CNQX (20 μ M) and tetrodotoxin (1 μ M). Pyr neurons in the CAP-treated rats showed a suppression of the amplitude of mIPSCs without changing their frequency. In contrast, FS neurons showed no significant change in the amplitude and the frequency of mIPSCs. These results suggest that ablation of unmyelinated primary sensory fibers may change the profiles of inhibitory local circuits in the insular cortex.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-85 嗅覚認識にかかわる神経回路の探索—7T fMRI を用いた結合解析

○深見 秀之, 佐原 資謹

岩医大 歯 生理

嗅覚認識について functional MRI (fMRI) を用いた研究が近年行われるようになってきた。しかし、嗅覚刺激でおこる BOLD 信号変化は他の感覚刺激に比べ小さいことや磁化率アーチファクトを受けるといった克服すべき問題点が多い。超高磁場 (7 Tesla) MRI を用いることで BOLD 信号の増大および高速、高解像度での撮像が可能となり、今回我々は、嗅覚認識に関わる神経回路の探索を行った。被験者には3種類の匂い刺激 (ペパーミント, コーヒー, 汗の匂い) および無臭の空気の sniffing を指示した。梨状皮質, 扁桃体, 海馬, 眼窩前頭皮質, 島皮質, 視床に関心領域 (ROI) を設定し解析を行ったところすべての領域で匂い物質および空気による賦活が見られた。一次嗅覚皮質である梨状皮質ではその前方部に匂い物質による賦活が、後方部では空気および匂い物質の sniffing による賦活が見られた。さらに、梨状皮質後方部, 視床, 眼窩前頭皮質内側部および外側部間の機能結合を dynamic causal modeling (DCM) により調べた。その結果、梨状皮質後方部から視床を経由して眼窩前頭皮質内側部に至る経路と梨状皮質後方部から直接眼窩前頭皮質内側部に至る2つの経路が明らかになった。他の感覚種では視床は大脳皮質の一次中枢へ投射する中継核であるが、嗅覚では視床は一次中枢である梨状皮質から入力を受け眼窩前頭皮質 (連合野) へと出力していることが示唆される。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Functional connectivity analysis of olfactory system—7 tesla fMRI study

○Fukami H, Sahara Y

Dept Physiol, Iwate Med Univ Sch Dent

Functional magnetic resonance imaging (fMRI) makes considerable advances in understanding the human olfactory system. In this study, we combined functional magnetic resonance imaging with connectivity analysis to identify olfactory pathways. We utilized an ultrahigh-field (7 tesla: 7T) MRI to increase the strength of BOLD signals as well as to improve the spatiotemporal resolution. Nineteen healthy volunteer were participated in this experiment. By odorants (isovaleric acid, peppermint and coffee) or odorless air sniffing, significant activation was detected in the piriform cortex, amygdala, hippocampus, thalamus, cingulate cortex, insula cortex and orbitofrontal cortex. Odorants sniffing activated both anterior and posterior regions of piriform cortex, whereas odorless air sniffing activated posterior region of piriform cortex. Functional connectivity was assessed by the dynamic causal modeling (DCM). The region of interest were set in posterior piriform cortex, dorsomedial thalamus, medial and lateral orbitofrontal cortex. Two pathways were found: (1) projection from the posterior piriform cortex to the orbitofrontal cortex via dorsomedial thalamus and (2) projection from the posterior piriform cortex to the orbitofrontal cortex. These results indicate that thalamus, unlike all other sensory modalities, receive input from primary olfactory cortex and project to orbitofrontal cortex.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-86 孤束核および傍腕核の細胞の誕生時期と分布部位の関係

○諏訪部 武, 安尾 敏明, 裕 哲崇

朝日大 歯 口腔生理

【緒言】胎生期の不良な栄養状態により、生まれてきた仔ラットに味覚障害が生じることが報告されていることから、胎生期は味覚にとって重要な時期であると考えられる。味覚伝導路の一次および二次中継核である孤束核および傍腕核を構成する細胞は胎生 11~14 日目の間に誕生することが報告されている。本研究では細胞誕生の時期と孤束核および傍腕核における分布部位との関係を調べた。【材料と方法】胎生 11~14 日目のいずれかの日にチミジン類似体を交配日確認妊娠ラットに腹腔内投与した。生後 21~25 日あるいは生後 80~90 日で仔ラットの脳をパラホルムアルデヒドで固定し、脳幹のスライス標本作製し、EdU 陽性細胞を蛍光色素で標識した。共焦点レーザー走査型顕微鏡で孤束核および傍腕核を撮影し、取得した画像上で EdU 陽性細胞の数をカウントし、胎生 11~14 日目の各日に誕生した EdU 陽性細胞の割合を算出した。【結果と考察】胎生 11~14 日目に誕生した細胞は孤束核および傍腕核の各亜核に均一に分布するのではなく、亜核によって胎生 11~14 日目に誕生した細胞の割合が異なることが明らかになった。この割合は生後 21~25 日と生後 80~90 日でほぼ同じであったことから、孤束および傍腕核の細胞構築は離乳期までに完成することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Cellular birthdate and distribution pattern in the nucleus of the solitary tract and parabrachial nucleus in rats

○Suwabe T, Yasuo T, Sako N

Dept Oral Physiol, Div Oral Funct Sci Rehabil, Asahi Univ Sch Dent

The nucleus of the solitary tract (NST) and the parabrachial nucleus (PBN) are the first and second central relays in the ascending gustatory pathway, respectively. They are composed of cells generated between embryonic day (E) 11 and E14. This study revealed that individual subnuclei of the NST and PBN were different in the cellular composition ratio. The ratios at postnatal day 21~25 were similar to those at postnatal day 80~90 in the NST and PBN indicating that the cellular composition in the NST and PBN is established by the weaning period.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-87 麻酔下ラット延髄の後索核と三叉神経核における体性感覚ニューロンの発火パターン解析

○宍戸新一郎^{1,2}, 戸田 孝史¹

¹東北大学 院歯 口腔生理

²赤門鍼灸柔整専門学校

【目的】体性感覚の一次中継核ニューロンが動的触刺激(こすり)に応答する際の発火パターンが刺激の方向などにより変化するかどうかを調べるため、単一ニューロン活動を記録しスパイク列の時間構造と平均発火頻度の解析を行った。【方法】ウイスター系雌性ラット6匹を用い、全身麻酔下(塩酸メedetミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルフェノール)で単一細胞外記録を行い、同じ方向について多数回(49-136回)の動的触刺激を行い、その際の神経応答を記録した。データ収集には Spike 2 (CED, UK) を用い off-line でスパイク弁別を行った。その上で、数値計算ソフト (Scilab, Scilab Consortium / Digiteo) に移し、発火パターン (regular, random, bursty) と平均発火頻度を解析した。隣接するスパイク間隔同士の相関を Shinomoto ら (2009) により考案された局所変動係数の改良型 (LvR) で評価し、ブートストラップ標本 (試行: 1,000 回) を作り、LvR と平均発火頻度の分布を調べた。LvR は、発火頻度の影響を受けずに時間構造を解析できる手法である。【結果と考察】5個のニューロンについて動的触刺激の方向を2-3通りに変化させた7ペアについて解析した。頭頸部、体幹上部の受容野を横切るように動的触刺激をすることで、0.3-1.5 sec の持続的反応が得られた。平均発火頻度は、15-85 Hz、LvR は、0.3-1.4 の範囲に分布していた。7ペアのうち4ペアではLvRの分布が重複せずに分かれており、さらに、このうち1ペアでは発火頻度の分布が重複していた。このことは、発火頻度に加え、スパイク列の時間構造が変化することで異なる刺激属性間の識別を容易にしている可能性を示唆するものである。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Temporal signaling patterns of somatosensory neurons in the dorsal column nucleus and trigeminal nucleus in the rat medulla

○Shishido S^{1,2}, Toda T¹

¹Div Oral Physiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Akamon Oriental Medical Coll

The neuronal firing pattern, as well as firing rate, is thought to be important to represent somatosensory information. We examined the spiking pattern of somatosensory neurons in the dorsal column nucleus and trigeminal nucleus of six female Wistar rats anesthetized with mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol. Single neuronal activities were recorded extracellularly when moving tactile stimulus (light rubbing) was applied in two or three directions (stimulus-pairs). After identifying single units off-line using Spike 2 softwares (CED), the data were exported to Scilab (Scilab Consortium / Digiteo). To quantify the temporal structure (regular, random, bursty), we used a metric of local variation (LvR) that evaluates the cross-correlation between consecutive interspike intervals (Shinomoto et al., 2009). The confidence intervals of the metric and the relation between the mean firing rate and the metric were constructed with 1,000 bootstrap samples. In four out of seven stimulus-pairs obtained from five neurons, LvR distributions did not overlap each other. On the other hand, in one of the four pairs, the distributions of mean firing rate overlapped largely. These suggest that the firing pattern, as well as the firing rate, might subserve discriminating different attributes of somesthetic stimuli.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-88 離乳前ラットと捕食者臭を用いた環境ホルモン曝露の影響評価

○藤本 哲也, 西川 泰央

大歯大 生理

【目的】ビスフェノール A (BPA) は代表的な環境ホルモンの 1 つであり, 歯科材料にも用いられる。我々は以前 BPA の胎児期曝露実験において 6 週齢以降の仔ラットについて行動試験を行い, 性差の消失, うつ情動の増強, 捕食者のニオイに対する回避行動を報告した。今回は, 離乳前のラットの行動様式について観察した。【方法】高濃度 (1,500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) および低濃度 (15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) の BPA を妊娠ラットに経口投与し, 8 日齢, 20 日齢の仔ラットについて自発行動ならびに捕食者のニオイ存在下での行動を 8 日齢で 2 分間, 20 日齢で 3 分間記録した。【結果】1. ニオイの影響: 8 日齢では, すべての実験群においてニオイ存在下で頭部運動, 旋回運動, 匍匐運動の減少, 不動時間の増大が認められた。この変化は高濃度曝露群では減弱した。同様に 20 日齢でも, 対照群, 低濃度曝露群で探索行動, 移動量の減少, すくみ時間の増大が認められたが, 高濃度曝露群ではすくみ時間に変動はなかった。2. BPA の影響: ニオイ非存在下での自発行動の比較で, 8 日齢ラットで曝露の影響はなく, 20 日齢では探索行動と移動量が, 低濃度, 高濃度いずれの群においても増加した。また, すくみ行動は低濃度曝露群においてのみ減少した。3. 血中コルチコステロン: 両群ともニオイ曝露により上昇するが, ニオイ非存在下では, 低濃度曝露群のみ低値を示した。【考察】捕食者のニオイに対する感受性は高濃度曝露群で抑制傾向にあり, ニオイ非存在下での自発行動様式として, BPA による多動性の誘発が認められた。また, すくみ行動は低濃度曝露群で顕著に抑制され, その背景としてストレス感受性との関わりが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Evaluation of prenatal treatments of an environmental endocrine disrupter using pre-weaning rats and a predator odor

○Fujimoto T, Nishikawa Y

Dept Physiol, Osaka Dent Univ

Bisphenol A (BPA) is known as an environmental endocrine disrupter. We focused on the behaviors in the pre-weaning rats. We administered BPA (high-dose; 1,500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and low-dose; 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) to pregnant rats, and offspring were examined under the presence or absence of predator fox odor. At 8 days of age, by the odor, decreases in a head movement and a pivoting, increases in an immobility, were displayed in all groups. However, these behavioral changes were attenuated in high-dose rats. At 20 days of age, a rearing and a locomotor activity were decreased and a freezing time was increased in control and low-dose rats. In high-dose rats, freezing time was not changed by the odor. In the spontaneous behaviors without odor at 20 days of age, both BPA treatments increased the rearing and the locomotor activity. However, freezing time was decreased only in low-dose rats. In absence of fox odor, only low-dose rats showed low level plasma corticosterone. Susceptibility to fox odor was suppressed in high-dose rats. In the spontaneous behaviors without odor, BPA rats showed the hyper active manner. In addition, it suggested that low-dose rats were in the condition of low-stress level.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-89 ノンレム睡眠時の咬筋活動に対するシタロプラムの作用

○野川 泰葉¹, 望月 文子², 加藤 隆史³, 片山 慶祐⁴, 安部 友佳⁴, 中村 史朗²,
中山希世美², 馬場 一美⁴, 若林 則幸¹, 井上 富雄²

¹医科歯科大 院医歯 部分床義歯補綴

²昭大 歯 口腔生理

³阪大 院歯 口腔解剖 2

⁴昭大 歯 補綴

抗うつ薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) がブラキシズムの増悪危険因子になり得ると報告されているが, SSRI が閉口筋である咬筋の活動にどのような影響を与えるか不明な点が多い. そこで, マウスに SSRI の一種であるシタロプラム (Citalopram: Cit) を投与し, 咬筋活動への影響を検討した. マウスに生体電気信号 (脳波, 眼電図, 頸筋・咬筋筋電図) の記録電極を留置し, 回復期・馴化期を経て生体電気信号を 24 時間記録した (0 日目). その後, 浸透圧ポンプを用いて, 生理食塩水 (生食), Cit 10 あるいは 100 mg/kg/day を持続投与し, 投与 6 日目の 24 時間, 生体電気信号を記録した. 咬筋活動量は, 10 秒エポック毎の積分値を求めた後, 0 日目の覚醒時の平均筋活動量を 100% として正規化して % 表示し, 6 日目の記録を各睡眠ステージ (覚醒, ノンレム睡眠, レム睡眠) ごとに分類し評価した. また, 15% 以上の咬筋活動量を示したエポック数を咬筋活動時間とした. 睡眠覚醒時間の日内変動パターンは, いずれの睡眠ステージにおいて 3 群に有意差はなかったが, レム睡眠の持続時間は, 生食群と比較して Cit100 mg 群で有意に増加した. 咬筋の筋活動量の日内変動パターンは, いずれの睡眠ステージにおいて 3 群に有意差はなかった. 一方, 咬筋活動時間の日内変動パターンについては, 暗期の 2-8 時および明期の 8-14 時のノンレム睡眠時において生食群と比較して Cit100 mg 群で有意に咬筋活動時間が増加した. 以上の結果から, 高濃度の Cit を投与すると強くは無いがノンレム睡眠時の咬筋活動を上昇させる効果があることが示唆された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

The effects of Citalopram on the modulation of masseter muscle activity during non-REM sleep

○Nogawa Y¹, Mochizuki A², Kato T³, Katayama K⁴, Abe Y⁴, Nakamura S², Nakayama K²,
Baba K⁴, Wakabayashi N¹, Inoue T²

¹Div Removable Partial Prosthodont, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent

³Dept Oral Anat Neurobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

⁴Dept Prosthodont, Showa Univ Sch Dent

The selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressants have been suggested to be one of the exacerbating factors of bruxism. However, it is unknown whether SSRIs affect masseter muscle activity. In this study, we investigated the effects of chronic administration of the SSRI citalopram, on the masseter muscle activity during wakefulness, non-rapid eye movement (NREM) sleep and REM sleep. EEG, EOG, and EMG (the masseter and neck muscles) in mice were simultaneously recorded for 24 h on the experimental day. Saline or citalopram (10 or 100 mg/kg/day: Cit10 or Cit100, respectively) were administered for 6 days using a subcutaneous osmotic minipump. Citalopram did not change the temporal pattern of sleep/wake distributions; however, Cit100 increased the duration of REM sleep episodes compared to saline. Citalopram did not affect the mean masseter EMG activity. However, Cit100 significantly increased the time engaged in the activation of masseter muscle in NREM sleep during the dark (02-08 h) and the light periods (08-14 h) compared to saline. These results suggest that higher dose of citalopram may weakly increase the masseter muscle activity during NREM sleep.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-90 歯根膜機械刺激によって誘発される大脳皮質体性感覚野および島皮質の応答特性

○金子 茉莉^{1,2}, 小林 真之², 清水 典佳¹, 堀貫 恵利^{1,2}

¹日大 歯 矯正

²日大 歯 薬理

【目的】我々は、歯根膜の電気刺激による感覚情報が体性感覚野および島皮質で処理されること、さらに矯正力が歯根膜刺激時の大脳皮質における神経応答に及ぼす影響について明らかにしてきた。しかし、歯根膜の機械刺激に対する大脳皮質の応答については不明な点が多い。そこで本研究では、ラットの上顎臼歯歯根膜に機械刺激を与えて大脳皮質で生じる神経活動の時空間的特性を調べ、電気刺激による応答と比較検討した。【試料および方法】実験にはSDラット（6-7週齢）を使用した。ウレタン麻酔下にて右側上顎臼歯歯頸部にそれぞれ結紮線を巻き付け固定した。左側頭部を開頭し、体性感覚野および島皮質を露出させ、膜電位感受性色素 RH1691 を負荷して皮質表面を染色した。歯根膜の機械刺激は、上顎臼歯歯頸部に固定した結紮線を牽引して行った。歯根膜の機械刺激に対する大脳皮質神経活動は、実体顕微鏡に CCD カメラを搭載した光学計測システムを用いて記録した。【結果および考察】上顎臼歯歯根膜の電気刺激に対する大脳皮質の応答は、二次体性感覚野および島皮質（S2/IOR）に、一方上顎臼歯に対する機械刺激では、尾側 S1 に応答が認められ、それに付随して電気刺激による応答より背尾側の S2 に応答が認められた。また機械刺激の特徴として、刺激終了時にも応答がみられ（rebound 応答）、この応答は牽引時間を 100 ms から延長するにつれて有意に増大した。これらの結果は電気刺激と機械刺激によって活性化される受容器が異なる可能性を示唆する。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The spatial profiles of cortical excitation induced by mechanical stimulation of the periodontal ligament

○Kaneko M^{1,2}, Kobayashi M², Shimizu N¹, Horinuki E^{1,2}

¹Dept Orthodont, Nihon Univ Sch Dent

²Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent

We have demonstrated that electrical stimulation to the periodontal ligament elicited excitation of the somatosensory and insular cortices, and that experimental tooth movement changes the cortical excitability. However, it is unknown the profile of cortical excitation responding to mechanical stimulation to the periodontal ligament. In the present study, we revealed the cortical regions that respond to mechanical stimulation of the maxillary first molar. We performed in vivo optical imaging to identify the cortical responses evoked by mechanical stimulation of the maxillary first molar in the rat. In naive rats, the response to electrical stimulation of the maxillary molar periodontal ligament induced excitation in the secondary somatosensory cortex (S2), and the insular oral region (IOR), whereas mechanical stimulation of the maxillary first molar elicited excitation in the caudal part of the primary somatosensory cortex (S1). Moreover, mechanical stimulation excited a part of S2 that located dorsocaudally adjacent to S2/IOR. The distinct feature of mechanical stimulation is the rebound response, which was evoked at the end of mechanical stimulation. The amplitude of the rebound response was increased when the duration of mechanical stimulation was extended over 100 ms. These results suggest electrical and mechanical stimulation elicit excitation of different sensory receptors.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-91 口唇随意運動時の脳活動の変化：fNIRS による分析

○黒瀬 雅之¹, 岡本圭一郎¹, 長谷川真奈^{1,2}, 中谷 暢佑^{1,3}, 藤井 規孝², 山田 好秋⁴,
佐藤 義英⁵, 山村 健介¹, 増田 裕次⁶

¹新潟大 院医歯 口腔生理

²新潟大 医歯病院 歯総診

³新潟大 院医歯 顎顔面口外

⁴東歯大

⁵日歯大新潟 生理

⁶松歯大 院 咀嚼機能

口唇機能は筋電図を中心とした電気生理学的手法により、その機能が評価されてきたが、“窄める”動作に代表されるように、もたらすベクトルは一方向ではなく口唇の複雑な機能の推察には十分な情報を提供しているとは言えない。そこで、我々は口唇閉鎖力を方向別に測定するシステムとして、多方位口唇閉鎖力測定装置を開発し、口唇随意運動機能の特性を明らかとしてきた。本研究では、Visual-feedbackを併用することで難易度の異なる口唇随意運動を施行させ、その際の脳活動を調べるためにfNIRSを用いて検討を行った。被験者には、ひずみゲージを貼付した8本の燐青銅板からなるプローブを口唇または左右手指で把持させた。前方のモニターに上下左右計8方向のターゲットを表記し、ターゲットにあわせて方向並びに閉鎖力を調整させた。被験者には、1: 左右側頭部に設置した18チャンネルのプローブ 2: 左右前頭部に設置した12チャンネルのプローブから酸素化ヘモグロビン濃度(oxy-Hb)を計測し、標準得点化を行った。口唇の随意的な運動時は、左右側頭部全体に渡りoxy-Hb値は上昇したのに対し、左指によるタスク時には右側で、右指によるタスク時には左側でoxy-Hbの値が上昇した。oxy-Hbの変化量は、口唇タスク時が有意に大きかった。本研究の結果から、随意的口唇閉鎖は、広い範囲に渡る脳部位の賦活化を促すことが示唆される。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Cerebral blood flow during voluntary lip movements using functional near-infrared spectroscopy (fNIRS)

○Kurose M¹, Okamoto K¹, Hasegawa M^{1,2}, Nakatani Y^{1,3}, Fujii N², Yamada Y⁴, Sato Y⁵,
Yamamura K¹, Masuda Y⁶

¹Div Oral Physiol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Gen Dent Clinic Educ Unit, Niigata Univ Med Dent Hosp

³Div Oral Maxillofac Surg, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

⁴Tokyo Dent Coll

⁵Dept Physiol, Nippon Dent Univ at Niigata

⁶Dept Oral Maxillofac Biol, Grad Sch Oral Med, Matsumoto Dent Univ

The present study aims to examine the change of blood flow during voluntary lip-closing task in the frontal and front-lateral areas of the cerebral cortex using functional near-infrared spectroscopy (fNIRS). Healthy, right-handed adults were participated in the experiment. The system for lip-closing task using the visual feedback system consisted of the apparatus that could measure the directional lip-closing force and a display showing the exerted lip-closing force for each direction in real time. Subjects were instructed to control the lip-closing force to maintain the target value shown in the display using visual-feedback. Same system was used for the finger task. A head cap for fNIRS was placed on the subject's head. The two optodes of the fNIRS were then attached to the frontal and front-lateral areas of the head cap. Cerebral blood flow during lip-closing task was increased in large cortical area on both sides. Significantly increase of blood flow during left finger task was observed in right cortical area. These results suggest that lip-closing task needs activation of larger cortical area on both sides whereas finger task mainly need activation of contralateral cortical area.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-92 咬筋および心筋における咬合挙上の筋肥大効果とデキサメタゾンの拮抗作用

○梅木 大輔¹, 大貫 芳樹², 伊藤 愛子¹, 八木澤由佳¹, 成山明具美³, 石川美佐緒⁴,
川村 直矢⁵, 中村 芳樹¹, 奥村 敏²

¹鶴大 歯 矯正
²鶴大 歯 生理
³鶴大 歯 小児歯
⁴鶴大 歯 口腔解剖
⁵鶴大 歯 歯周病

【目的】咬合挙上は、咬筋に対して力学的負荷を増大し筋肥大を誘発するが、過度な咬合挙上はストレス負荷により全身の交感神経を亢進させて他臓器に影響を及ぼす可能性がある。一方、ステロイド系抗炎症薬は筋萎縮を誘発することが知られているが、筋肥大抑制効果に関しては不明な点が多い。本研究では、実験動物としてマウスを用い、咬筋と心筋におけるBOの筋肥大効果および、それに対するデキサメタゾン(DEX)の拮抗作用について検討した。【方法】10w 齢のC57BL/6 雄性マウスを、対照群(Control n=5)、咬合挙上(BO)群(下顎切歯に咬合挙上板装着 n=5)、DEX群(1.6 mg/kg/2 日, i.p. n=5)、BO+DEX群(n=5)の4群に分けた。2w 飼育後、咬筋、ヒラメ筋、心筋を摘出し、筋重量/脛骨長の比(mg/mm)および筋線維断面積(CSA:μm²)を計測した。【結果と考察】(1)BO群では、咬筋のCSAと筋重量の増加傾向を認めた。心筋では筋重量(Control vs. BO: 7.74±0.21 mg/mm vs. 10.16±0.91 mg/mm, p<0.05)の著しい増加を認めたがヒラメ筋では有意な差は認められなかった(P=NS)。(2)DEX群では、咬筋CSAの萎縮(Control vs. DEX: 1633.6±62.1 μm² vs. 1109.2±27.4 μm², p<0.01)を伴う筋重量の減少(Control vs. DEX: 6.00±0.13 mg/mm vs. 5.05±0.17 mg/mm, p<0.05)を認めたが、心筋筋重量に変化は認められなかった。(3)BO+DEX群では、咬筋CSAの萎縮(Control vs. BO+DEX: 1633.6±62.1 μm² vs. 983.4±154.5 μm², p<0.01)を伴う筋重量の著しい減少(Control vs. BO+DEX: 6.00±0.13 mg/mm vs. 4.31±0.23 mg/mm, p<0.01)が認められた。心筋、ヒラメ筋では有意な差は認められなかった(P=NS)。DEXは、咬合挙上により誘発される心肥大を抑制したが、咬筋に対しては咬合挙上による筋肥大を抑制するだけでなく顕著な筋萎縮をも誘発した。これらの結果は、咬筋と心筋ではDEXに対する感受性またはその作用機序が異なることを示唆する。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Inhibitory effects of dexamethasone on bite opening-induced hypertrophy in masseter and cardiac muscles

○Umeki D¹, Ohnuki Y², Ito A¹, Yagisawa Y¹, Nariyama M³, Ishikawa M⁴, Kawamura N⁵,
Nakamura Y¹, Okumura S²

¹Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med

⁴Dept Oral Anat, Tsurumi Univ Sch Dent Med

⁵Dept Periodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Objective: To examine hypertrophic effects of bite opening (BO) on masseter and cardiac muscles as well as antagonistic action of dexamethasone (DEX), a glucocorticoid, against hypertrophy, we analyzed both muscle mass and fiber diameter of masseter, soleus and cardiac muscles in BO and/or DEX-treated mice.

Methods: Male mice (C57BL/6), aged 10 weeks, were divided into four groups: Control, BO (1 mm increase in the vertical dimension), DEX (injected i.p. with 6 mg/kg/2d) and BO + DEX. After 2 weeks of each treatment, we measured both the muscle weight and fiber cross sectional area (CSA) in order to evaluate hypertrophic effect of BO and/or DEX on masseter, soleus and cardiac muscles.

Results: Compared with Control group, the muscle mass and fiber CSA were increased in masseter and cardiac muscles of BO group. They were significantly decreased only in masseter muscle of DEX and BO+DEX groups, compared with those of Control group. Soleus muscle was not affected by either BO or DEX.

Conclusion: DEX antagonized BO-induced hypertrophy in masseter and cardiac muscles. In masseter muscle, moreover, DEX induced muscle atrophy even in BO+DEX group, suggesting differences in the sensitivity to DEX or in the mechanisms of DEX antagonism between masseter and cardiac muscles.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-93 癌周囲組織における筋の修復と High mobility group box 1 (HMGB1) の分布

○小峰 雄介^{1,2}, 崎山 浩司¹, 瀧澤 将太², 坂東 康彦¹, 天野 修¹

¹明海大 歯 解剖

²明海大 歯 口腔顎顔面外科

【目的】我々はこれまで癌が浸潤・転移する際に High mobility group box 1 (HMGB1) が強く関与することを報告した。さらに組織の修復に関しても HMGB1 が関与することが示唆されている。そこで癌の浸潤によって壊死した筋細胞が再生される過程で HMGB1 およびその受容体である Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) がどのように関与するのか検索した。**【方法】**BALB/cAJcl ヌードマウスを用い、舌尖の左側方を刺入点とし 1 週間に 1 度のペースで計 2 回、SCC7 癌細胞を注入し、移植・着床を試みた。この群を SCC7 群、ポジティブコントロールとして DMEM 培養液を注入した群を DMEM 群と設定した。注入終了後 2, 4, 6 週間経過した後に試料を採取し観察を行った。観察部位は舌中央とし、抗 HMGB1 抗体と抗 RAGE 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行い観察した。**【結果】**全ての SCC 群で、舌癌が定着しているのが確認されたが、6 週間後の群では癌細胞の範囲が縮小していた。また免疫組織化学的染色では全ての群で HMGB1, RAGE が舌癌部と、癌周囲の筋線維で発現が認められた。しかしながら、6 週間後の群において再生した筋線維の周囲では、HMGB1 は発現したのに対し、RAGE は発現を認めなかった。**【考察】**以上の結果から、癌周囲には HMGB1/RAGE 系が共局在しており、癌の浸潤に関与することが示唆されるが、筋組織が再生したと思われる部位では HMGB1 が局在しているのに対し、RAGE は局在しなかったことから、筋の再生に対しても HMGB1 は積極的に関与しているのではないかと示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Muscle repair and distribution of high mobility group box 1 (HMGB1) in the peri-cancerous tissue

○Komine Y^{1,2}, Sakiyama K¹, Takizawa S², Bando Y¹, Amano O¹

¹Div Anat, Meikai Univ Sch Dent

²Div Oral Maxillofac Surg, Meikai Univ Sch Dent

We reported that high mobility group box 1 (HMGB1) was involved in cancer invasion and metastasis. Furthermore, it is suggested that HMGB1 was related to tissue repair. We investigated the expression of HMGB1 and its receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in the peri-cancerous tissue. SCC7 cells were injected a once a week for 2 weeks into the BALB/cAJcl nude of mice tongue in order to create the cancer model. DMEM was injected as a control. Mice were kept for 2, 4 or 6 weeks after the last injection. Tongues were dissected out and cut with a cryostat for immunohistochemistry using anti HMGB1 and anti RAGE antibodies. SCC7 cells injected have formed cancer tissues in the tongue. The cancer area was reduced at 6 weeks after injection. HMGB1 and RAGE were expressed in peri-cancerous myofibers as well as cancer cells. HMGB1 was also found in intercellular spaces around regenerating myofibers, whereas RAGE was not seen at 6 weeks after injection. Our results revealed the localization of HMGB1 to regenerating myofibers. Therefore, HMGB1 may be involved in the myofiber-cancer interaction.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-94 C2C12 筋芽細胞において MyoD と CDK6 は miR-29a-Tet1 経路により制御される

○安藤 準

鶴大 歯 物理

骨格筋の発生、再生には筋特異的な microRNA である miR-1, -133, -206, -486, -499 による筋分化調節因子の発現調節が存在する。しかし近年それら以外の microRNA の関与も明らかにされ、また筋分化調節因子の直接的制御のみならず、他の因子を介した間接的制御も解明されつつあり、microRNA による筋分化調節は複雑な制御ネットワークであることが分かってきている。そこで本研究では C2C12 培養筋芽細胞を用いて、筋分化を促進することが知られる miR-29a について、詳細の明らかでないその作用機序の解明を試みた。MTT 法で解析したところ、miR-29a のインヒビター処理により顕著に C2C12 細胞の増殖が促進した。また Real-time PCR 法により解析すると、miR-29a のインヒビター処理により ten-eleven translocation enzyme-1 (Tet1) mRNA の発現量が顕著に増加した。そこで Tet1 mRNA の発現をインヒビターにより抑制すると、MyoD mRNA の発現量が顕著に増加し、反対に cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6) mRNA の発現量が顕著に減少した。一方で Srf, Mef2a,b,c, myogenin, Mrf4, Mck, Cdk4, Tdg については、miR-29a および Tet1 の抑制による mRNA の発現量の顕著な変化は認められなかった。これらの結果より、miR-29a は、Tet1 を介して筋分化因子である MyoD の発現と、増殖因子である Cdk6 の発現を同時に調節していることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

MyoD and CDK6 are regulated by miR-29a-Tet1 pathway in the C2C12 myoblast cells

○Ando H

Dept Biophys, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Skeletal myogenesis is regulated by a considerable number of microRNAs such as miR-1, -133, -206, 486, -499. microRNA regulatory networks are complicated, and details regarding microRNA regulation remain unclear. In this study, MTT assays confirmed that miR-29a is the most effective miR-29 paralog. Microarray analysis demonstrated the upregulation of ten-eleven translocation enzyme-1 (Tet1) mRNA by miR-29a inhibition in the C2C12 murine myoblast cells. We investigated the downstream factors of the miR-29a-Tet1 signal pathway using real-time RT-PCR. MyoD expression was upregulated by Tet1 inhibition and downregulated by miR-29a inhibition, but cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6) expression was oppositely regulated. These results suggest that the miR-29a-Tet1 pathway upregulates MyoD expression and it oppositely downregulates Cdk6 expression. However, expression changes of other myogenic factors such as Srf, Mef2a, b and c, myogenin, Mrf4, Mck, Cdk4 and Tdg cannot be explained by the miR-29a-Tet1 pathway alone. The miR29a-Tet1 pathway may be a part of a complicated myogenic regulatory network in C2C12 cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-95 咬筋における小眼球症関連転写調節因子 *mitf* の生理機能の解明

○成山明具美¹, 大貫 芳樹², 梅木 大輔³, 伊藤 愛子³, 川村 直矢⁴, 八木澤由佳³,
奥村 敏², 朝田 芳信¹

¹鶴大 歯 小児歯

²鶴大 歯 生理

³鶴大 歯 矯正

⁴鶴大 歯 歯周

小眼球症関連転写調節因子 *Mitf* (Microphthalmia-associated transcription factor) は慢性カテコラミン刺激による心肥大の発症過程に重要であることが報告されているが、骨格筋肥大形成過程における役割については不明である。本研究では、*Mitf* の骨格筋肥大形成過程における生理学的役割を明らかにするために、*Mitf* 遺伝子変異型マウス (*mi/mi*) を用いて、ベータアドレナリン受容体 (β -AR) のうち骨格筋の主要なサブタイプ (β 2-AR) の選択的作動薬であるクレンプテロール (CB) の慢性投与実験を行った (2 mg/kg/day for 3 weeks ip)。その結果 CB 投与後の筋重量/脛骨 (tibia) 比は、野生型 (WT) では、速筋型骨格筋である咬筋 (from 7.7 \pm 0.2 to 9.0 \pm 2.9, n=6-8, P<0.01) ならびに前脛骨筋 (from 3.7 \pm 0.2 to 4.4 \pm 0.1, n=6-8, P<0.05) と心筋 (from 9.5 \pm 0.2 to 10.7 \pm 0.3, n=7, P<0.05) で有意に増加したが (P<0.05)、遅筋型骨格筋であるヒラメ筋 (from 0.8 \pm 0.02 to 0.8 \pm 0.03, n=6-8) では有意な増加は確認されなかった (P=NS)。一方 *mi/mi* では、骨格筋ならびに心筋のいずれも、CB の慢性投与による有意な肥大効果は確認されなかった。なお咬筋の筋線維横断面積 (CSA; μ m²) の測定結果からも、WT では CB 投与により肥大効果が確認されたが (from 1850 \pm 93 to 2754 \pm 136, n=6-9, P<0.01)、*mi/mi* では有意な増加は確認されなかった (from 805 \pm 8.3 to 966 \pm 11, n=5-6, P=NS)。以上の結果から CB の慢性投与による肥大は、遅筋型骨格筋に比較して速筋型骨格筋に顕著に確認され、その過程で *Mitf* が重要な役割を演じていることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Role of microphthalmia-associated transcription factor in masseter muscle hypertrophy induced by β 2-adrenoceptor stimulation

○Nariyama M¹, Ohnuki Y², Umeki D³, Ito A³, Kawamura N⁴, Yagisawa Y³, Okumura S²,
Asada Y¹

¹Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

⁴Dept Periodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

Microphthalmia-associated transcription factor (*Mitf*) is known to play an important role for the development of cardiac hypertrophy in response to chronic catecholamine stress. However, the role of *Mitf* on skeletal muscle hypertrophy remains poorly understood. In order to clarify the role of *Mitf* on skeletal muscle hypertrophy in response to β -AR stimulation, we performed chronic β 2-AR (a major skeletal muscle subtype) stimulation with clenbuterol (CB) in microphthalmic mice (*mi/mi*) with the *Mitf* gene mutation and wild-type controls (WT). In masseter (MA; a typical fast-twitch muscle), tibialis anterior (a typical fast-twitch muscle) muscles and heart, the muscle mass/tibial length (TL) ratio was significantly (P < 0.05) increased after CB treatment in WT, but not in *mi/mi*. In addition, the CB treatment significantly (P < 0.01) increased cross-sectional area (CSA) of MA myofiber in WT, but not in *mi/mi*. On the other hand, soleus muscle (a typical slow-twitch muscle) was not affected by the CB treatment in either WT or *mi/mi*. These results suggest that *Mitf* plays an important role for the development of fast-twitch muscle hypertrophy in response to chronic CB treatment, as shown in cardiac hypertrophy.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-96 TGF- β 1 は Slug/Wnt-5b/MMP-10 のシグナル伝達系によりヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-4 の浸潤能を誘導する

○加茂 政晴¹, 樋野 雅文², 客本 齊子¹, 石崎 明¹

¹岩医大 歯 生化 細胞情報科学

²岩医大 歯 口顎顔面再建外 口外

【目的】 口腔癌細胞の浸潤の基礎をなす分子機構は依然として明らかでないままである。我々はこれまでに TGF- β 1 は、ヒトの口腔扁平上皮癌細胞である HSC-4 細胞において間葉マーカーの発現を誘導することを明らかにしてきた。また TGF- β 1 刺激により上皮間葉転換に関する転写制御因子 Slug の発現は有意に増大した。そこで TGF- β 1 により誘導された Slug が HSC-4 細胞の浸潤能を増大するシグナル伝達の機序の解明を試みた。

【方法】 細胞株を TGF- β 1 含有培地にて 2 または 5 日間培養し、浸潤に関与する遺伝子とタンパク質は qRT-PCR およびウェスタンブロットによりそれぞれ解析した。上清は質量分析によるタンパク質解析を行った。浸潤能の解析には Matrigel をコーティングした invasion chamber により分析した。

【結果と考察】 プロテオーム解析により TGF- β 1 を刺激された細胞においてマトリックスメタロプロテアーゼ-10 (MMP-10) が発現上昇することが示された。さらに TGF- β 1 により誘導された HSC-4 細胞の浸潤能の増加が MMP-10 siRNA により有意に阻害されることが示された。興味深いことに、Slug siRNA は TGF- β 1 により誘導された MMP-10 の発現を抑制した。これらの結果は、TGF- β 1 が Slug 依存的に MMP-10 の発現増大を介して HSC-4 細胞の浸潤を誘導することを示した。一方、Slug siRNA は TGF- β 1 により誘導された Wnt-5b 発現を抑制した。Wnt-5b の添加により MMP-10 の発現を有意に増大すること及び、Wnt-5b siRNA が TGF- β 1 により誘導された浸潤能の増大を抑制することは、TGF- β 1 により誘導された MMP-10 の発現増大と浸潤能の増大が Wnt-5b を介して生じることを示している。以上の結果から、TGF- β 1 は Slug/Wnt5b/MMP-10 シグナル伝達系により HSC-4 細胞の浸潤能を増大することが示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

TGF- β 1 induces invasion ability of human oral squamous cell carcinoma cell HSC-4 through the Slug/Wnt-5b/MMP-10 signaling axis

○Kamo M¹, Hino M², Kyakumoto S¹, Ishisaki A¹

¹Div Cell Biosig Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ Sch Dent

²Div Oral Maxillofac Surg, Dept Reconst Oral Maxillofac Surg, Iwate Med Univ Sch Dent

Background: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) promotes the invasion of oral cancer cells, but the underlying molecular mechanisms are poorly understood. We previously demonstrated that TGF- β 1 induces the expression of mesenchymal markers in human oral squamous cell carcinoma (hOSCC) HSC-4 cells. Intriguingly, the expression of the EMT-related transcription factor Slug was also significantly upregulated upon TGF- β 1 stimulation. However, the mechanism by which Slug transduces the TGF- β 1-induced signal to enhance the invasiveness of HSC-4 cells, is poorly understood.

Results: Proteomic analysis revealed that the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-10 was upregulated in TGF- β 1-stimulated cells. Additionally, the invasion chamber assay revealed that the TGF- β 1-induced increase in invasiveness of HSC-4 cells was significantly inhibited by MMP-10 siRNA. Intriguingly, Slug siRNA suppressed TGF- β 1-induced expression of MMP-10. These results suggest that TGF- β 1 induces invasion in HSC-4 cells through the upregulation of MMP-10 expression in a Slug-dependent manner. On the other hand, Slug siRNA suppressed TGF- β 1-induced Wnt-5b expression. Wnt-5b significantly induced MMP-10 expression, while Wnt-5b siRNA suppressed the TGF- β 1-induced increase in invasiveness, suggesting that TGF- β 1-induced expression of MMP-10, and the resulting upregulation of invasiveness, are mediated by Wnt-5b.

Conclusion: These results suggest that TGF- β 1 stimulates HSC-4 cell invasion through the Slug/Wnt-5b/MMP-10 signaling axis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-97 角化嚢胞性歯原性腫瘍の角化機序

○落合 隆永¹, 中野 敬介², 長谷川博雅¹

¹松歯大 口腔病理

²岡大 院医歯薬 口腔病理

【緒言】角化嚢胞性歯原性腫瘍 (KCOT) は上皮組織の錯角化を特徴とする歯原性良性腫瘍である。上皮組織の角化には周辺帯の形成が重要な役割を有することが知られている。Small proline-rich proteins (SPRs) は周辺帯形成に重要な役割を有し、皮膚では有棘細胞の細胞質に局在することが知られている。今回我々は、KCOT における角化関連タンパク質である SPR の局在を検討した。

【材料と方法】松本歯科大学病院で診断した角化嚢胞性歯原性腫瘍を 20 例抽出し実験に用いた。対照群は炎症反応や腫瘍性変化のない正常歯肉上皮を用いた。通法に従いホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製し、SPR である SPR1a, SPR1b, SPR2 および SPR3 を一次抗体とする免疫染色をアミノ酸ポリマー法で行った。【結果】KCOT における SPR1a は有棘層と表層の核に陽性であり、僅かに細胞膜への局在があった。SPR1b 有棘層上層と表層の細胞質に局在した。SPR2 と SPR3 は表層の細胞質に陽性であった。歯肉上皮での SPR1a は有棘層の核に陽性であった。SPR1b は有棘層の細胞質に局在した。SPR2 は有棘層の核と細胞質に局在をみた。SPR3 は有棘層上層の細胞質に陽性であった。【考察】SPR が錯角化層で陽性となる所見は KCOT に特異的な所見であり、歯肉上皮と KCOT での角化機序が異なる可能性が考えられる。さらに、KCOT での SPR1b 発現は歯肉上皮と同様に広い範囲で発現した。この結果は SPR1b が SPR1a, SPR2 および SPR3 よりも KCOT での錯角化機序に強い影響を持つ可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Keratinization mechanism in keratocystic odontogenic tumor

○Ochiai T¹, Nakano K², Hasegawa H¹

¹Dept Oral Pathol, Matsumoto Dent Univ

²Dept Oral Pathol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

Purpose: Parakeratosis is a characteristic feature of keratocystic odontogenic tumor (KCOT). Small proline-rich proteins (SPRs) are important substances for keratinization. Therefore, we investigated the localization of SPR-family in KCOT. **Materials & Methods:** We selected 20 cases of KCOTs from the archives of Laboratory of Surgical Pathology at Matsumoto Dental University Hospital. Sixteen cases of gingiva were served as controls. SPR1a, SPR1b, SPR2 and SPR3 were immunohistochemically analyzed. **Results:** SPR1a was mainly positive in nuclei of parakeratinized and upper spinous layers. The parakeratinized and upper spinous layers of KCOTs showed cytoplasmic positive reactions against the SPR1b-antibody. SPR2 and SPR3 were localized in the only superficial part of the epithelium of KCOTs. In control specimens, the upper one or two-third of the spinous layer was positive for all SPRs but the parakeratinized layer were negative. **Conclusion:** The SPR-positive reactivity of parakeratinized layer could be a characteristic feature of KCOT. This might be based on the difference between the component of KCOT and control in parakeratinization. Furthermore, the widespread staining pattern of SPR1b in KCOT is similar to that in the control, which seems to be a representative feature that SPR1b relates to parakeratinization of KCOT rather stronger than SPR1a, SPR2 or SPR3.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-98 口腔扁平上皮癌進展における分子シャペロン R2TP の作用機序の解析

○柿原 嘉人¹, 山崎 学², 木口 哲郎¹, 佐伯万騎男¹

¹新潟大 院医歯 歯科薬理

²新潟大 院医歯 口腔病理

R2TP は、出芽酵母で最初に同定され、哺乳類においても構造的、機能的に広く保存されている。ヒト R2TP は RuvBL1, RuvBL2, RPAP3, PIH1D1 の4つの異なるタンパク質から成り、RuvBL1 と RuvBL2 はヘテロ六量体リングに PIH1D1 が直接結合し、さらに RPAP3 が PIH1D1 に結合した安定な complex である。これまでに、この complex は、細胞分裂・増殖に必須であるリボソーム合成、PIKK シグナリングや RNA ポリメラーゼ II 形成に関わることが明らかにされているが、その中で、発表者らは、R2TP が mTOR パスウェイの mTORC1 複合体のアセンブリーやリボソーム RNA 前駆体のメチル化に関わる box C/D snoRNP のアセンブリーを助けるシャペロン機能を持つことを明らかにしてきた。増殖活性の高い口腔扁平上皮癌細胞においても R2TP が何らかの機能を担っていることが考えられるが、未だ報告はない。口腔扁平上皮癌の免疫組織染色の結果、特に悪性度の高い癌組織において R2TP の顕著な核局在が観察された。さらに、培養細胞 (HSC-2, HSC-4) を用いた蛍光染色では、RuvBL1 と RuvBL2 は、主に核に局在することが示されたが、PIH1D1 については、核膜周辺に強いシグナルが観察された。本大会では、進行中の分子生物学的実験データを併せて、R2TP の口腔扁平上皮癌進展におけるメカニズムについて発表する。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Functional analysis of R2TP in progression of oral squamous cell carcinoma

○Kakahara Y¹, Yamazaki M², Kiguchi T¹, Saeki M¹

¹Div Dent Pharmacol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Div Oral Pathol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

The R2TP is well-conserved protein complex from yeast to human, and is composed of the AAA+ (ATPases Associated with diverse cellular Activities) proteins of RuvBL1 and RuvBL2, as well as PIH1D1 and RPAP3. Recent studies have shown that the R2TP is involved in ribosome biogenesis, PIKK signaling, and RNA polymerase II activity. We have demonstrated that the R2TP supports the assembly of mTORC1 complex and box C/D snoRNP by its chaperone function. We could speculate that the R2TP may regulate the cellular activity of OSCC (oral squamous cell carcinoma) cells, but its mechanism is unknown so far. To investigate its role in cancer cells, we determined the localization of R2TP in OSCC surgical specimens by immunohistochemical analysis. As a result, we observed the R2TP localization in nuclei especially in OSCC with high-grade histology. Furthermore, we analyzed the localizations in OSCC cell lines such as HSC-2 and HSC-4. RuvBL1 and RuvBL2 mainly localized in nuclei whereas PIH1D1 localized in nuclear periphery. Taken together with our ongoing analyses, we will propose our current model of R2TP function in progression of OSCC.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-99 関節リウマチ滑膜線維芽細胞による VE-カドヘリン依存性疑似血管形成と細胞内シグナル伝達

○山口 光祐, 須藤 遥, 今井 一志

日歯大 生命歯 院歯 生化

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は全人口の約 0.5~1% に発症する全身性炎症性疾患で、滑膜組織内の血管様管腔構造形成の増加が病変の進行と密接に関連し、その形成阻害がより効果的な治療薬の開発につながると期待されている。我々は管腔構造の形成に滑膜線維芽細胞 (RA synovial fibroblast-like cells, RSFLs) による疑似血管形成が大きな役割を果たす可能性を明らかにした。本研究では、疑似血管形成に重要な VE-カドヘリンの発現を誘導するシグナル伝達系について、ウエスタンブロットとマトリゲルを用いたチューブアッセイで解析した。VEGF 受容体 (VEGFR2) を発現する RSFLs はそれ自身あるいは周囲環境由来の VEGF の刺激により VE-カドヘリン依存性に管腔構造を形成することから、VEGFR2 インヒビター (SU1498)、VEGFR2 下流で活性化される ERK/MAPK のインヒビター (PD98059) と PI3K のインヒビター (LY294002) により RSFLs を処理した。その結果、これらのインヒビターは VE-カドヘリンの発現を著しく低下させ、VEGF/VEGFR2 の下流シグナルである MEK/ERK/MAPK と PI3K/Akt のリン酸化を強く阻害した。次に、RSFLs による管腔構造形成をチューブアッセイにより検討した。その結果、インヒビター添加による管腔形成阻害が確認された。従って、RSFLs は VEGF 刺激により ERK/MAPK と PI3K/Akt シグナルをオートクリン・パラクリンの活性化し、VE-カドヘリン発現を誘導することで管腔構造を形成すると考えられる。以上の結果は、RSFLs による VE-カドヘリン依存性疑似血管形成は VEGF/VEGFR2 の下流で活性化される ERK/MAPK 系と PI3K/Akt 系に大きく依存することを示し、RA 患者の治療における新たな標的となる可能性を示唆する。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Signaling pathways for VE-cadherin-dependent vasculogenic mimicry formation by synovial fibroblast-like cells of rheumatoid arthritis

○Yamaguchi K, Sudo H, Imai K

Dept Biochem, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory disease that affects 0.5~1% of the population, and an increase of vessel-like vasculatures in the synovium closely associates with the disease progression and expects that its inhibition contributes to develop a novel strategy to treat the patients. We previously reported that fibroblast-like cells (RSFLs) contribute to formation of vasculogenic mimicry in RA synovium. In this study, we analyzed signaling pathways to induce the vasculogenic mimicry by westernblot and tube-assay using matrigel. Since RSFLs expressing a VEGF receptor (VEGFR2) form VE-cadherin-dependent vascular structures by the VEGF stimulation in autocrine and/or paracrine fashions, we treated RSFLs with a VEGFR2 inhibitor (SU1498) or inhibitors for ERK/MAPK (PD98059) or PI3K (LY294002) that are activated under the VEGFR2 stimulation. These inhibitors strongly suppressed the VE-cadherin expression and phosphorylation of MEK/ERK/MAPK and PI3K/Akt proteins. Then we examined a contribution of RSFLs in vasculogenic mimicry formation by the tube assays. The inhibitors significantly hindered the tube formation. These results demonstrate that VE-cadherin-dependent formation of vasculogenic mimicry by RSFLs largely depend on the ERK/MAPK and PI3K/Akt pathways activated under VEGF/VEGFR2, and suggest that its inhibition is a novel strategy to treat the patients.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-100 Interleukin-33 (IL-33) による matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 発現増強メカニズムの解明

○有吉 渉¹, Chaweewannakorn Wichida^{1,2}, 沖永 敏則¹, 西原 達次¹

¹九歯大 感染分子生物

²九歯大 口腔機能発達

Interleukin-33 (IL-33) は IL-1 family に属するサイトカインであり、これまでに、種々の組織における発現や免疫応答を主体とする活性が報告されているが、詳細な生物学的活性については知見が少ない。今回、IL-33 が単球・マクロファージ系に及ぼす作用について、マトリックス分解酵素である matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) に着目して研究を行った。

マウス単球・マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に対して、IL-33 を添加し、培養を行った。刺激後の細胞において、MMP-9 の遺伝子およびタンパクレベルの発現亢進、および培養上清中への MMP-9 分泌の亢進が観察された。RAW264.7 細胞表面には IL-33 受容体である ST2L が恒常的に発現しており、中和抗体および siRNA を用いて IL-33-ST2L の相互作用を阻害したところ、IL-33 による MMP-9 の発現誘導は抑制された。

この MMP-9 の発現誘導に関わる細胞内シグナルの解析では、IL-33 刺激により、extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) タンパクのリン酸化および核内移行が亢進し、ERK1/2 阻害剤前処理群では、IL-33 による MMP-9 の発現誘導が抑制された。さらに、IL-33 刺激による ERK1/2 のリン酸化により、cAMP response element binding protein (CREB) および転写因子 AP-1 の活性化を介して、MMP-9 の発現が亢進することが明らかとなった。以上の結果から、IL-33 は ST2L との相互作用により、ERK1/2-CREB-AP1 経路の活性化を介して、MMP-9 発現を正に制御することで種々の炎症応答に関与する可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Mechanisms involved in enhancement of matrix metalloproteinase-9 expression by Interleukin-33

○Ariyoshi W¹, Wichida C^{1,2}, Okinaga T¹, Nishihara T¹

¹Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ

²Div Pediatr Dent, Kyushu Dent Univ

Endothelial transmigration of macrophage is accomplished by matrix metalloproteinase (MMP)-induced degradation of basement membrane and extracellular matrix component. Macrophages up-regulates MMP-9 expression and secretion upon immunological challenges and require its activity or migration during inflammatory response. Interleukin (IL)-33 is a recently discovered pro-inflammatory cytokine that belongs to the IL-1 family. The aim of this study was to elucidate the mechanisms underlying IL-33-induced MMP-9 expression in the mouse monocyte/macrophage RAW264.7 cells.

IL-33 increased MMP-9 mRNA and protein expression in RAW264.7 cells. Blockage of IL-33-IL-33 receptor (ST2L) binding suppressed IL-33-mediated induction of MMP-9. IL-33 induced the phosphorylation and nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies indicated that IL-33 increased c-fos recruitment to the MMP-9 promoter and reporter assay findings also revealed that IL-33 stimulated the transcriptional activity of AP-1. Pre-treatment of the cells with specific inhibitor of ERK1/2 attenuated the IL-33-induced phosphorylation of AP-1 subunits, transcriptional activity of AP-1 and the expression of MMP-9. We also demonstrated that ERK-dependent activation of cAMP response element binding protein (CREB) is a key step for AP-1 activation by IL-33. Our results indicate an essential role for ERK in the induction of MMP-9 in monocyte/macrophage through CREB-AP-1 activation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-101 肥満細胞におけるテトラヒドロビオプテリンによるセロトニン生合成の促進

○大橋 晶子, 笠原 正彰, 内藤 昌子, 高橋 富久

日大 歯 解剖 I

【目的】セロトニン合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素 (TPH) の活性は, その補酵素であるテトラヒドロビオプテリン (BH4) 濃度に依存することから, セロトニン合成過程において TPH 活性と BH4 濃度は密接な関係にあると考えられている. 肥満細胞において FcεRI 刺激にตอบสนองしてセロトニンが合成され, 細胞外へ放出されるが, 肥満細胞における TPH 活性と BH4 の取込みパターン, すなわち BH4 が関係した細胞膜輸送の分子メカニズムについては詳しく理解されていない. 本研究はラット肥満細胞株 RBL2H3 細胞を用いて, BH4 の取込みによる TPH 活性の促進メカニズムについて検討した. 【方法】RBL2H3 細胞を BH4 存在下で培養し, 細胞内に蓄積した BH4 量と, 細胞内の TPH 活性をそれぞれ定量した. TPH 活性はセロトニン生合成経路の芳香族-L-アミノ酸脱炭酸酵素を NSD-1015 で阻害して一定時間内に蓄積したセロトニン前駆体 (5HTP) 量によって定量した. 【結果】RBL2H3 細胞の培養系に BH4 を添加することで, 細胞内の BH4 レベルは経時的に増加した. 細胞内への BH4 の取り込みパターンは, 細胞外 BH4 の濃度依存的に取込まれる一方向型と細胞内・外の BH4 濃度変化に対応して, それぞれの方向へ BH4 が輸送される双方向平衡型が識別された. また, 双方型では細胞外 BH4 を下げると細胞内 BH4 濃度はもとの濃度に速やかに復帰する特徴がみられた. さらに, 双方向型の取り込みでは細胞外 BH4 濃度に比例して速やかに細胞内の BH4 を高濃度にするが, 細胞外 BH4 濃度を高く維持しても TPH 活性の促進は認められなかった. すなわち, 双方型では BH4 は TPH の補酵素として利用できない状態にあることが考えられた. これに対して, 一方向型では細胞内の BH4 濃度の上昇に追従して TPH 活性が促進したことから, 肥満細胞における, セロトニン合成は細胞外からの BH4 供給によって促進されることが明らかとなった.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Tetrahydrobiopterin enhances serotonin biosynthesis in mast cells

○Ohashi A, Kasahara M, Naito M, Takahashi T

Dept Anat, Nihon Univ Sch Dent

It has been known that mast cells synthesize serotonin by tryptophan hydroxylase (TPH) with a coenzyme tetrahydrobiopterin (BH4). However, exact molecular mechanism of BH4 uptake and BH4-mediated TPH activity in mast cells has not been well understood. In this study, BH4 uptake and TPH activity were analyzed using a rat mast cell line, RBL2H3 cells. On administration of exogenous BH4, intracellular BH4 level was increased by dose and time-dependent manners. The BH4 uptake was a mixed process of a bidirectional membrane transport and unidirectional one. In the former type, the amount of intracellular BH4 was increased, but TPH activity was not elevated, suggesting that BH4 is unavailable as a coenzyme of TPH in cytoplasm. In the latter type, however, amount of intracellular BH4 was gradually increased along with TPH activity in a dose-dependent manner of exogenous BH4. These results suggest that the mast cells able to utilize extracellular BH4.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-102 口腔病原体の誘引する腸内細菌叢バランス異常が非アルコール性脂肪肝疾患の病態進展に与える影響

○大坂 利文

東女医大 医 微生物免疫

非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) はメタボリックシンドロームの肝表現型である。NAFLD の病態形成機構としては、肥満やインスリン抵抗性を起因とした脂肪肝に、腸管由来のエンドトキシン、サイトカイン、酸化ストレスなどのストレス因子が加わることで、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) へと進行すると考えられている。近年、腸内細菌叢のバランス異常 (Dysbiosis) が NAFLD 病態進展に寄与することが示唆されている。とくに、NAFLD モデル動物や肝硬変患者の腸内において、*Poryphromonas gingivalis* をはじめ、*Streptococcus* 属、*Fusobacterium* 属、*Veillonella* 属などの口腔細菌の下部消化管の定着が報告されている。そこで本研究では、口腔病原体が腸内細菌叢に与える影響に着目し、口腔細菌の異所性感染と NAFLD 病態形成の関連性を解明することを目的とした。食餌誘導性肥満マウスモデルに *Porphyromonas gingivalis* および *Streptococcus intermedius* を持続投与 (経胃投与) した場合に、NAFLD の病態進展に与える影響を評価した。約 12 週間後の腸管および肝臓における炎症性サイトカインの産生を評価したところ、口腔病原体の持続投与は小腸あるいは大腸における炎症性サイトカインの産生に影響を与えなかったが、肝臓における炎症性サイトカインの産生能が亢進していることがわかった。つまり、肝臓は口腔病態投与に伴う腸内環境の変化を感知し、NAFLD 感受性が増加している可能性が示唆された。また腸内細菌叢を解析したところ、いずれの口腔病原体投与群においても、腸炎惹起性細菌群 (*Bacteroidales*, *Bacteroides* 属) や肝癌関連細菌 (*Peptostreptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*) などのポピュレーションが増大していた。以上のことから、口腔病原体は下部消化器内の Dysbiosis を誘発し、この腸内細菌叢の質的変化が NAFLD 病態進展リスクの増加に寄与することが示唆された。(非学会員共同研究者：八木淳二、上芝秀博)

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effect of oral pathobionts-induced gut dysbiosis on the NAFLD progression

○Osaka T

Dept Microbiol Immunol, Tokyo Women's Med Univ

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered to be a hepatic manifestation of metabolic syndrome. Recently, an imbalance of gut microbiota (dysbiosis) has been highlighted as possible driving forces for the progression of NAFLD. Also, it has been reported the relationship the NAFLD progression and the infection of *Porphyromonas gingivalis* (periodontitis) or colonization of oral microbiota (e.g. *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Veillonella*) in the hindgut. However, the involvement of oral pathobionts on the NAFLD pathogenesis remain obscure. Thus, this study aimed to investigate whether oral pathobionts-induced alteration in the gut environments is the contributing factor of NAFLD progression. C57BL/6 mice were fed with a high caloric diet to develop obesity, and intragastrically administrated with live oral pathobiont (i.e. *P. gingivalis*, *Streptococcus intermedius*) for 12 weeks. Long-term administration of oral pathobionts led to enhance the production of inflammatory mediators in the liver. Meta 16S rRNA sequence analysis of the gut microflora revealed that the administration of both pathogens led to an increase in the *Bacteroidaceae*, unclassified *Bacteroidales*, *Erysipelotrichaceae*, *Verrucomicrobiaceae*. In conclusion, the alteration in gut environments by swallowing of oral pathobionts confers the susceptibility to NAFLD progression.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-103 低出力レーザー照射が血管内皮細胞の一酸化窒素と血管内皮細胞増殖因子発現に与える影響

○茂呂祐利子, 原田 卓哉

奥羽大 歯 放射線

【目的】 低出力レーザーには抗炎症作用等があることが報告され, 歯科治療において広く臨床応用されている. しかし, その作用機序については未知である. 今回我々は, 一酸化窒素(NO)と血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の動態に注目し, 低出力レーザーの血管内皮細胞に対する抗炎症効果について検討を行った.

【方法】 血管内皮細胞を培養し, 低出力レーザーを照射した. 培地にリポポリサッカライドを添加したもの(LPS 添加群)しないもの(コントロール群)に分け, それぞれレーザーを照射した. 24時間後の一酸化窒素合成量および VEGF 量を NO₂/NO₃測定キット, VEGF ELISA kit を用いて定量した. また, 一酸化窒素合成酵素(n-NOS, i-NOS, e-NOS)と VEGF の発現を免疫染色法にて観察した.

【結果】 NO₂/NO₃定量の結果, LPS 添加群において照射群では一酸化窒素合成量が減少した. また, VEGF 量はコントロール群, LPS 添加群ともに照射群で変化はなかった. 免疫染色の結果から, コントロール群においては照射群で e-NOS, n-NOS の発現が増強し, LPS 添加群において照射群で i-NOS の発現が減弱した. 一方, VEGF はコントロール群, LPS 添加群ともに照射群で変化はなかった.

【考察】 以上の結果から, 炎症時における低出力レーザーによる血管内皮細胞の一酸化窒素合成量の減少には i-NOS が関与することが明らかとなり, 一酸化窒素合成の減少を通して抗炎症効果に影響を及ぼすことが示唆された. 一方, VEGF については変化がないことから, 血管新生促進への効果は薄いと考えられたが, これには本実験におけるレーザーの照射条件が関わっている可能性があるのではないかと推測され, 今後この点についても検討していく予定である.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Influence of low-energy laser irradiation on nitric oxide and VEGF expression in vascular endothelial cells

○Moro Y, Harada T

Div Radiol Diag, Ohu Univ Sch Dent

We investigated the anti-inflammatory effect of low-energy laser on endothelial cells. i-NOS was involved in the low-energy laser-induced decrease in nitric oxide synthesis.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-104 ヒスタミンによる血管内皮細胞透過性の亢進を抑制するデクスメトミジン塩酸塩の作用機序

○深田 哲也¹, 戸円 智幸¹, 橋本 修一², 砂田 勝久³

¹日歯大 生命歯 共同利用研究セ アイソトープ研究施設

²日歯大 生命歯

³日歯大 生命歯 麻酔

【目的】血管内皮細胞間の間隙は厳密に制御されており、通常、低分子化合物しか通過できない。しかし、炎症時には histamine (His) などのメディエーターが血管内皮細胞に作用し、細胞間隙の拡張を引き起こす。その結果、血漿タンパク質などが実質組織に漏洩し、炎症の兆候の一つである浮腫を形成する。我々は、His あるいは carrageenan 誘発足浮腫形成とヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) の His による透過性亢進に、dexmedetomidine (Dex) が抑制的に作用することをすでに報告している。今回、我々は HUVEC を用いて Dex の血管透過性抑制のメカニズムについて検討を行った。【方法】血管内皮細胞接着因子 (VE-cadherin) の免疫染色; HUVEC の培養液に 0.1 μM His および Dex を添加し、抗 VE-cadherin 抗体を用いて免疫染色を行った。細胞は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、画像解析ソフトを用いて細胞間隙を計測した。血管内皮細胞型 NO 合成酵素 (eNOS) とリン酸化の検出; HUVEC の培養液に 0.1 μM His および Dex を添加し、経時的に eNOS, リン酸化 eNOS を各特異的抗体を用いた western blotting 法により検出した。【結果と考察】細胞膜上の VE-cadherin の蛍光染色による計測から算出した細胞間隙は、His 処理により拡張した。これに対し、10 μM Dex で前処理することで His 処理細胞間隙は未処置細胞と同程度に抑制された。一方、eNOS 活性に関与するリン酸化を検討したところ、HUVEC に His を添加すると添加 2 分後より eNOS のリン酸化が確認された。このリン酸化は 10 μM Dex で前処理することで抑制された。両実験により VE-cadherin の状態は、eNOS に由来する NO により調節を受けていると考えられた。以上の結果から、Dex は透過性抑制メカニズムには eNOS と VE-cadherin を介した細胞間接着の増強が重要な役割を果たしていることが示された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

The mechanism of dexmedetomidine hydrochloride effects to the vascular permeability of human umbilical vein endothelial cells induced with histamine

○Fukada T¹, Toen T¹, Hashimoto S², Sunada K³

¹Sect Radioisotopes Res, Res Center for Odontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

²Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

³Dept Dent Anesthesiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Purpose ; In inflamed tissue, the intercellular space of vascular endothelial cells expands by chemical mediators such as histamine. Plasma proteins in blood vessels is leaked out through the expanded space and the edema in tissue is induced. We have shown that dexmedetomidine (DEX) inhibited the histamine (HIS)-induced release of FITC-dextran (MW 4000) via the intercellular expanded space in mono-layer of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). In this study, we investigated the effect of DEX on the HIS-induced expansion of the intercellular space. **Methods** ; HUVECs were treated with 0.1 μM HIS and/or DEX. VE-cadherins, the cell adhesion molecule of HUVECs, control the intercellular space. These were analyzed by immunohistochemistry using a confocal microscope. The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) passway in HUVECs participates in the association of VE-cadherins. The ratio phosphor-eNOS to eNOS in HUVECs were analyzed with western blotting. **Results and Discussion** ; Pretreatment of 10 μ DEX before addition of HIS inhibited both the HIS-induced dissociation between VE-cadherin dimer and the HIS-induced phosphorylation of eNOS. Our results suggest that the DEX-induced inhibitions of eNOS-phosphorylation and VE-cadherin-dissociation reduce the HIS-induced intercellular expansion space of vascular endothelial cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-105 MALDI-TOF-MS 法による食物アレルギーモデルマウスの腸内細菌叢の解析

○片岡 嗣雄, 桑田 啓貴

昭大 歯 口腔微生物

【目的】食物アレルギーの発症は、腸管組織の免疫系の破綻が原因の一つと考えられている。腸管組織の免疫系に影響を及ぼす腸内細菌はいくつか報告されているが、腸内細菌と食物アレルギーの発症との関連性は未知である。本研究では、食物アレルギーモデルマウスを作製し、その腸内細菌叢の構成の変化を調べた。【方法】食物アレルギーモデルマウスは、卵白アルブミン (OVA) を抗原として、アジュバントの水酸化アルミニウムゲル (Alum) と混合し、近交系マウス (BALB/c, 7 週齢雌, 体重 20g) に腹腔内投与して作製した。その後、OVA を経口投与して食物アレルギーを誘導した。食物アレルギーの成立は、血清中の抗 OVA-IgE 量で評価し、食物アレルギー症状は、OVA 経口投与直後の直腸温で評価した。マウスの腸内細菌叢は、採取した糞便をコロニビア 5% ヒツジ血液寒天平板上で培養した後、平板上に出来たコロニーを MALDI-TOF-MS 法 (VITEK MS 使用) で解析して評価した。マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 における IL-33 の発現はリアルタイム PCR 法で評価した。【結果と考察】OVA と Alum の混合物で感作した BALB/c は、コントロール群マウスと比べて血清抗 OVA-IgE 量が多く、OVA 経口投与直後の直腸温も低下していた。これらのマウスから採取した糞便中には、*Citrobacter amalonaticus* が有意に多く見られた。また、採取した糞便から単離した複数種の菌でマウス線維芽細胞株 NIH-3T3 を刺激すると、*Citrobacter amalonaticus* が濃度依存的に IL-33 の発現を促進した。以上の事から、食物アレルギーによって腸内で増殖した *Citrobacter amalonaticus* が、腸管でのアレルギー症状を増悪させている可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

MALDI-TOF-MS Analysis of gut microbiota in murine model of food allergy

○Kataoka H, Kuwata H

Dept Microbiol Immunol, Showa Univ Sch Dent

Purpose: Food allergy is thought to be a dysfunction of gut immune systems. Although some intestinal bacteria are reported to affect them, causal relationships between food allergy and gut microbiota is still unknown. In this study, we analyzed constitutions of gut microbiota in a murine model of food allergy.

Materials & Methods: Murine food allergy model was developed by intraperitoneal injections of ovalbumin (OVA) mixed with aluminum hydroxide gel (Alum) to female BALB/c mice. These mice were orally administrated OVA to induce food allergy. Anti-OVA IgE in the mice serum was quantified by ELISA, and induction of food allergy was evaluated by rectal temperature. Fecal bacteria of the mice were identified by VITEK MS MALDI-TOF MS analysis. Expression of IL-33 in NIH-3T3 cells was detected by real time PCR. **Results & Discussion:** Intraperitoneal injections of OVA significantly increased anti-OVA IgE level in the mice serum. And rectal temperature of the mice decreased after oral administration of OVA. An Intestinal bacterium, *Citrobacter amalonaticus*, proliferated in the mice feces. This bacterium induced IL-33 expression in NIH-3T3 cells higher than other fecal bacteria. Above all, *Citrobacter amalonaticus* is shown to proliferate vigorously in gut of food allergic mice, and it will aggravate food allergy.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-106 病原微生物による歯周病の免疫学的解析

○永尾 潤一, 成田 由香, 田崎 園子, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田 (森岡) 健一,
長 環, 田中 芳彦

福歯大 機能生物 感染生物

歯周病は口腔内の歯周病原細菌が原因となり発症する疾患であり, 歯を喪失する最も大きな原因となる。歯周病の病態には, ヘルパー T 細胞による免疫応答が深く関与し, その中でもサイトカイン IL-17 を産生する T 細胞サブセットである Th17 細胞が重要な役割を果たすことが明らかになっている。しかしながら, 歯周病において Th17 細胞の分化を誘導する免疫制御機構は分かっていない。本研究では, 歯周病原細菌の抗原性に着目し, 歯周病の病態形成における Th17 細胞の制御機構の解明を目的とする。歯周病原細菌として, ゲノムシーケンスが決定されている *Porphyromonas gingivalis* W83 株を用いた。マウス口腔内に *P. gingivalis* を感染後, 末梢リンパ節から CD4⁺ T 細胞を単離した。単離した CD4⁺ T 細胞を抗原提示細胞である骨髄由来樹状細胞と *P. gingivalis* 全菌体成分を用いて *in vitro* において抗原刺激し, Th17 細胞への分化をフローサイトメトリーにより評価した。その結果, *P. gingivalis* 全菌体成分に Th17 細胞への分化誘導能が確認された。また非感染と比べ, *P. gingivalis* 感染により Th17 細胞の割合が高くなることが明らかとなった。現在, *P. gingivalis* の T 細胞エピトープの同定のために *P. gingivalis* 全菌体成分から抗原タンパク質の絞り込みを行っている。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Investigation of immune response against periodontal-pathogen *Porphyromonas gingivalis*

○Nagao J, Narita Y, Tasaki S, Hashimoto M, Ikezaki S, Arita-Morioka K, Cho T,
Tanaka Y

Div Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll

Periodontal disease is a chronic inflammatory disease caused by oral bacterial biofilm consisting of periodontal pathogens that result in tissue inflammation and alveolar bone loss. There is increasing evidence of potential role of the adaptive immune response, particularly the inflammatory cytokine IL-17 and IL-17-producing CD4⁺ T cells (Th17 cells) in alveolar bone loss. However, the mechanism to induce Th17 immune response against periodontal pathogens has not yet been determined. In this study, we investigated the immune regulatory mechanism against periodontal pathogens by focusing on Th17 differentiation. *Porphyromonas gingivalis* W83, a major contributor to periodontal disease, was used in this study. We investigated the effect of oral inoculation of *P. gingivalis* in mice on the induction of Th17 cells. CD4⁺ T cells in peripheral lymph nodes were more efficiently differentiated into Th17 cells *in vitro* than those of non-inoculated mice. We also found that *P. gingivalis* whole cells induced Th17 differentiation. We are trying to identify the CD4⁺ T-cell epitopes of *P. gingivalis* to induce Th17 differentiation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-107 オメガ3脂肪酸は歯周病細菌侵入マクロファージが誘導するインフラマソーム活性を抑制する

○沖永 敏則¹, 有吉 渉¹, 臼井 通彦², 西原 達次¹

¹九歯大 感染分子生物

²九歯大 歯周

【目的】脂肪酸は、細胞の生命活動に必須である一方、様々な疾患との関わりが報告されている。そのなかでも不飽和脂肪酸 (ω -3系脂肪酸)であるドコサヘキサエン酸 (DHA)には、炎症応答を制御することが報告されている。我々は、歯周病細菌侵入マクロファージにおいて、インフラマソームが活性化され、炎症性サイトカインの発現が誘導されることを報告してきた。そこで、今回、DHAの歯周病細菌誘導マクロファージに誘導されるインフラマソーム活性に及ぼす影響について検証した。【方法】通法に従い、歯周病細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4株を用い、ヒトマクロファージ THP-1細胞に侵入実験を行った。 ω 3脂肪酸としてDHAを用いた。遺伝子発現はReal-Time RT-PCR解析、タンパク発現はウェスタンブロッティング解析およびELISAを行った。ノックダウン細胞はsiRNA導入により構築した。【結果】THP-1細胞をDHAで刺激したところ、インフラマソーム関連因子ASCの発現が抑制された。*A. actinomycetemcomitans*侵入マクロファージにて誘導されるインフラマソーム関連因子NLRP3やcaspase-1 p10の発現は、DHA前刺激により抑制された。さらに、*A. actinomycetemcomitans*により誘導される炎症性サイトカインIL-1 β の細胞外産生も抑制された。また、siRNAによるASCノックダウン細胞では、*A. actinomycetemcomitans*侵入において、caspase-1 p10やIL-1 β の発現は抑制され、インフラマソーム活性は抑えられた。【考察】以上の結果から、DHAは、インフラマソーム関連因子の発現を抑制することで、歯周病細菌侵入マクロファージにおいて誘導されるインフラマソーム活性を抑制することが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Docosahexaenoic acid downregulates inflammasome activity induced by *A. actinomycetemcomitans* invasion in macrophages

○Okinaga T¹, Ariyoshi W¹, Usui M², Nishihara T¹

¹Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ

²Div Periodontol, Kyushu Dent Univ

Objective: It is well known that the deficiency of fatty acids can lead to chronic inflammatory disease. In particular, previous study reported that omega-3 fatty acids, such as docosahexaenoic acid (DHA), suppress inflammatory activation and play a crucial role in inflammatory human diseases. Periodontitis is known to be an infectious disease caused by bacterial infection, followed by inflammation. In the present study, we clarified the role of omega-3 fatty acids in periodontopathic bacteria-invaded macrophages.

Materials and Methods: Periodontopathic bacterium, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 was used in this study. Human macrophage THP-1 cells were invaded with *A. actinomycetemcomitans* Y4. The gene expression was confirmed by Real-Time RT-PCR. The protein expression was detected by Western blotting and ELISA. **Results:** DHA downregulated the expression of inflammasome-related protein, ASC in THP-1 cells. The expression of NLRP3 and caspase-1 p10 induced by *A. actinomycetemcomitans* invasion was downregulated in DHA-treated THP-1 cells. In addition, DHA treatment downregulated the secretion of IL-1 β . Depletion of ASC downregulated the expression of IL-1 β in *A. actinomycetemcomitans*-invaded THP-1 cells. **Discussion:** These results indicate omega-3 fatty acid, particularly DHA downregulated the inflammasome activity in THP-1 cells induced by *A. actinomycetemcomitans* through the downregulation of ASC expression.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-108 マウス骨髄由来培養細胞において間葉系幹細胞は未分化単球／マクロファージを免疫抑制性マクロファージへと誘導する：細胞接着の関与

○客本 齊子¹, 滝沢 尚希², 大久保直登³, 鈴木 啓太^{1,2}, 帖佐 直幸¹, 衣斐 美歩⁴, 加茂 政晴¹, 八重柏 隆², 石崎 明¹

¹岩医大 生化 細胞情報科学

²岩医大 歯 歯周

³北大 院薬 臨床病態

⁴岩医大 薬 分子細胞薬理

【目的】 間葉系幹細胞(MSC)はその組織修復能力に加え、最近では免疫制御能力にも注目されてきている。我々はこれまでに、我々が開発したマウス骨髄組織からMSCと血球系細胞を同時に増殖させる独自の培養系を用いて、血球系細胞(未分化単球・Mφ系細胞)が共培養されたMSCの作用により制御性(創傷治癒促進性)MφマーカーであるCD206陽性(約70-80%)のM2-Mφに分化誘導されていることを明らかにした。さらに血球系細胞のマクロファージM2化に関与するMSC由来のサイトカインAの存在を見出した。そこで本研究では、血球系細胞のマクロファージM2化にMSCと血球系細胞の接着が関与するか否かを、接着分子と受容体に対する阻害剤や中和抗体を用いて検討した。

【方法】 tdTomato TG マウス骨髄組織を採取し接着因子受容体阻害剤ならびに接着因子中和抗体の存在下、非存在下で二週間培養を行った。Lineage (Lin) Cell Depletion Kitと磁気細胞分離装置を用いて、MSC(Lin-)と血球系細胞(未分化単球・Mφ系細胞/Lin+)とに分離後、これらの細胞を用いて、M2マーカー発現をフローサイトメトリーならびに定量的RT-PCR法で、また接着関連分子の発現を定量的RT-PCR法で調べた。

【結果・結論】 ある接着因子(接着因子B)の受容体に対する阻害剤は血球系細胞(Lin+)のマクロファージM2化を一部阻害した。また、接着因子Bに対する中和抗体はMSCと血球系細胞の結合を一部阻害したことから、接着因子Bが両細胞の接着に関与していることが示唆された。またRT-PCR法により、これら接着因子とそのレセプターがMSCと血球系細胞にそれぞれ発現していることを確認した。これらの結果から、接着因子Bを介したMSCと血球系細胞の接着(結合)がMSCによるCD206やIL10発現の上昇を伴うマクロファージM2化に一部関与している可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

MSCs polarize undifferentiated monocytes/macrophages to the immunosuppressive macrophages in the co-culture of bone marrow cells: implication of cell adhesion

○Kyakumoto S¹, Takizawa N², Okubo N³, Suzuki K^{1,2}, Chosa N¹, Ibi M⁴, Kamo M¹, Yaegashi T², Ishisaki A¹

¹Div Cell Biosignal Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ

²Div Periodontol, Iwate Med Univ Sch Dent

³Lab Pathophysiol and Therapeut, Fac Pharma Sci, Hokkaido Univ

⁴Dept Mol Cell Pharma, Sch Pharma Sci, Iwate Med Univ

We have found that the blood cells are differentiated to the CD 206 (alternatively activated macrophage marker)-positive immunosuppressive (M2) macrophages in the co-culture of MSC and blood cells derived from mouse bone-marrow. We have found the implication of cytokine A secreted by MSC in the M2 macrophage polarization of blood cells. In this study, we investigated the implication of the adhesion of both cells in the M2 macrophage polarization of blood cells by using the specific inhibitors or the neutralizing antibodies to the adhesion molecules and their receptors. The addition of a specific inhibitor of the receptor for the adhesion molecule B to the co-culture partly inhibited the up-regulation of CD206 in blood cells. Moreover, the neutralizing antibody to adhesion molecule B partly inhibited the binding of these cells, suggesting that the ligand (adhesion molecule B)-receptor system is related to the adhesion of these cells. Quantitative RT-PCR confirmed the expression of the adhesion molecule B and its receptor in MSCs and blood cells, respectively. These results suggested that the direct adhesion of MSC and blood cells mediated by these molecules is partly responsible for the M2 polarization of blood cells concomitant with up-regulation of CD206 and the immunosuppressive cytokine IL10.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-109 マウス扁平上皮癌細胞のインターフェロン耐性は IFN 誘導性タンパク質 p204 (Ifi204) の非発現による

○山口 花, 大森 喜弘

明海大 歯 微生物

【背景】 インターフェロン (IFN) は抗腫瘍作用を有するサイトカインであるが腫瘍細胞の中には IFN に耐性を示すものもあり, IFN の臨床応用を阻む一つの障壁となっている. 一昨年の本学会においてその耐性機構の解明の一環として, マウス扁平上皮癌細胞株 SCCVII の IFN γ の細胞増殖抑制作用に対する耐性機構について解析を行い, IFN γ の情報伝達経路 (Jak-STAT) は正常であるが, その下流の細胞周期制御因子の発現を制御している Rb タンパク質の IFN γ による脱リン酸化機構に問題があることを報告した. その中で Rb タンパク質の機能制御に関与している IFN 誘導性タンパク質 p200 ファミリー (Ifi200) 遺伝子の発現が, SCCVII では損なわれていることを見出した. この遺伝子発現の不活性化は, メチル化阻害剤による前処理で IFN γ による発現誘導が認められたことから Ifi200 ファミリー遺伝子の IFN γ に対する不応答性にメチル化の関与が示唆された. 今回, Ifi200 ファミリータンパク質の機能解析を目的として Ifi200 ファミリータンパク質が SCCVII の細胞増殖を抑制するのか発現ベクターを作製し検討した. **【結果】** Ifi203, Ifi204, Ifi205 のそれぞれの発現ベクターを SCCVII に一過性に遺伝子導入し, BrdU の取り込みを指標として DNA 合成に対する影響を検討したところ, Ifi204 の発現により DNA 合成が顕著に抑制された. 一方, Ifi203, Ifi205 の発現ベクターの導入ではタンパク質の発現は認められたが有意な DNA 合成の抑制効果は認められなかった. これらの結果から Ifi204 が SCCVII において細胞増殖抑制作用を示し, この Ifi204 遺伝子発現の IFN γ に対する不応答性が SCCVII の IFN 耐性のメカニズムであることが示唆された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Resistance to IFN of mouse squamous cell carcinoma is due to impaired expression of the interferon-inducible protein p204 (Ifi204)

○Yamaguchi H, Ohmori Y

Div Microbiol Dept Oral Biol Tissue Eng, Meikai Univ Sch Dent

Background: Interferon-gamma (IFN γ) is a well-known cytokine that has antitumor functions. However, many tumor cells resist treatment with IFNs. To elucidate the molecular mechanisms responsible for the resistance to the IFN γ -mediated effect, we previously examined the effect of IFN on the growth of mouse squamous cell carcinoma cell line SCCVII. We found that although IFN-induced JAK-STAT signaling pathway was normal, dephosphorylation of Rb protein by IFN γ was not observed in SCCVII. Interferon-inducible p200 (Ifi200)-family proteins, which interact with Rb protein, were not expressed in SCCVII by the DNA methylation in the promoter region. In the present study, to examine the functions of Ifi200-family proteins, we constructed expression vectors of these proteins and analyzed whether Ifi200-family proteins inhibit the growth of SCCVII. **Result:** SCCVII were transiently transfected either Ifi203 or Ifi204 or Ifi205 expression vector and assessed the rate of DNA synthesis by measuring BrdU incorporation. Although a marked inhibition of BrdU incorporation was observed in Ifi204-transfected cells, no inhibitory effect of BrdU incorporation was observed in Ifi203 or Ifi205-transfected cells. These results indicate that Ifi204 has ability to inhibit cell growth of SCCVII and that the impaired expression of the Ifi204 gene is the mechanism for the resistance to IFN.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-110 口腔癌細胞におけるアポトーシス制御因子 GRIM-19 の発現制御機構

○廣井 美紀¹, 森 一将², 嶋田 淳², 大森 喜弘¹

¹明海大 歯 口腔生物再生医工 微生物

²明海大 歯 病態診断治療 口腔顎顔面外科

【緒言】 GRIM-19 は IFN β およびレチノイン酸 (RA) の共刺激により誘導されるアポトーシス制御因子である。我々は以前、本学会において口腔扁平上皮癌細胞株における GRIM-19 の発現制御機構の解析を行い、HSC-2 細胞における GRIM-19 タンパク質の非発現および Ca9-22 細胞における IFN β , RA 共刺激で誘導される GRIM-19 の発現は、遺伝子の転写レベルではなくタンパク質分解系が関与している可能性を示した。そこでユビキチン/プロテアソーム依存性のタンパク質分解システムの関与について Lactacystin など阻害剤を用いて検討したところ、プロテアソームでの分解系の関与はないことが明らかとなった。GRIM-19 は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の構成因子の 1 つであることから、今回ミトコンドリアタンパク質の分解系であるマイトファジーの関与について検討した。**【方法および結果】** マイトファジーが関与しているか否かを検討するために、オートファジーの阻害剤である 3-メチルアデニン (3-MA) を添加し、Western blot 法により GRIM-19 の発現を検討した。その結果、Ca9-22 細胞では IFN β , RA 共刺激による GRIM-19 の発現が増強した。この結果は Ca9-22 細胞における GRIM-19 の発現にオートファジーが関与している可能性が考えられた。一方、HSC-2 細胞では 3-MA の存在下でもその発現は認められなかった。HSC-2 細胞では恒常的な GRIM-19 の mRNA 発現が認められることから HSC-2 細胞における非発現は、GRIM-19 遺伝子のコード領域の塩基配列に変異が存在する可能性が考えられた。現在、Ca9-22 細胞のミトコンドリア分画における GRIM19 の発現およびオートファゴソームと GRIM19 の局在について検討を行っている。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The regulation of expression of GRIM-19 in oral squamous carcinoma cells

○Hiroi M¹, Mori K², Shimada J², Ohmori Y¹

¹Div Microbiol, Meikai Univ Sch Dent

²Div Oral Maxillofac Surg, Meikai Univ Sch Dent

GRIM-19 (for genes associated with retinoid-interferon mortality) is an apoptotic control factor induced by co-stimulation of interferon-beta (IFN β) and retinoic acid (RA). We previously examined mechanisms for the expression of GRIM-19 in human oral squamous cell carcinoma cell (OSCC) lines, and found the possibility that impaired expression of GRIM-19 in HSC-2 and up-regulation of the protein in Ca9-22 cells co-stimulated with IFN β and RA were regulated at proteolysis mechanism such as ubiquitin-dependent proteolysis, but not at transcriptional level. However, treatment with proteasome inhibitor Lactacystin had no effect on the GRIM-19 expression in these cells. Because GRIM-19 is a component of mitochondrial respiratory chain complex I that plays an indispensable role in the mitochondrial function and integrity, we investigated whether mitophagy involved in the expression of GRIM-19 in the OSCCs. Western blot analysis demonstrated that although autophagy inhibitor 3-MA up-regulated the expression of GRIM-19 in Ca9-22 cell, the inhibitor had no effect on the expression in HSC-2 cell. Since constitutive expression of GRIM-19 mRNA was observed in HSC-2 cells, nucleotide sequence of the coding region of the GRIM-19 gene might be mutated in the cells. The results also suggest that mitophagy is involved in the expression of GRIM-19 in Ca9-22 cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-111 低濃度 TLR7/8 アゴニスト全身投与の抗腫瘍効果と PD-L1 阻害との併用

○西井 直人^{1,2}, 立浪 秀剛¹, 近藤 雄太¹, 原田 浩之², 東 みゆき¹

¹医科歯科大 院医歯 分子免疫

²医科歯科大 院医歯 顎口腔外科

Resiquimod は、TLR7 および TLR8 に結合可能な合成リガンドで、種々のサイトカイン産生を増強し、ウイルスおよび癌に対する免疫応答を増強する。しかしながら、副作用の問題から、局所投与剤としての臨床試験が進められている。また、PD-1 あるいは CTLA-4 などの免疫チェックポイント阻害療法は、メラノーマ患者において、腫瘍の縮小および生存期間の延長などの画期的な効果を示しているが、効果の得られる症例は約3分の1程度に限られており、至適な併用療法等の開発が課題となっている。本研究では、Colon 26 (未分化大腸癌) および SCCVII (皮膚扁平上皮癌細) の2つのモデルを用いて低濃度 Resiquimod の全身投与と PD-L1 阻害の単独あるいは併用効果を検討した。腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の解析で、Colon 26 では、かなりの比率の CD8T 細胞浸潤が認められたのに対して、SCCVII では制御性 T 細胞 (Treg) の比率が多く、2つの癌では明らかに異なる免疫応答が誘導されていることが示された。Colon 26 では、PD-L1 阻害あるいは Resiquimod 単独では僅かな腫瘍縮小効果しか見られなかったが、併用により劇的に腫瘍が縮小した。併用療法では、TIL における CD8 細胞の活性化には影響を与えず、Treg 比率を減少させていた。SCCVII では、Resiquimod 単独で顕著な腫瘍抑制が認められ、併用ではさらなる効果が得られた。本結果から、腫瘍微小環境 (TME) の状態が Resiquimod の効果に多大な影響を与えることが示された。今回使用した様な TME への Treg 集積が強い扁平上皮癌モデルでは、Resiquimod の全身投与が効果的であることが示唆された。(非会員共同研究者: L.Li and W. Lau, Birdie Biopharma.)
【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Antitumor effects of systemic administration with a low dose TLR7/8 agonist and its combined therapy with PD-L1 blockade

○Nishii N^{1,2}, Tachinami H¹, Kondo Y¹, Harada H², Azuma M¹

¹Div Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

²Div Oral & Maxillofac Surg, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Resiquimod is a synthetic molecule that binds to TLR7 and TLR8 and it enhances antitumor immune responses via multiple cytokine production. In this study, we examined the effects of a low dose resiquimod and/or PD-L1 blockade in two different tumor models (Colon 26 and SCCVII). Inoculation of two tumor cell lines exhibited completely different immunological status in the tumor microenvironment (TME); Colon 26 and SCCVII induced much higher recruitment of CD8+ T cells and Tregs, respectively. Despite a partial effect by resiquimod or PD-L1 blockade, combined treatment dramatically reduced the tumor growth of Colon 26. This treatment significantly increased the activation of CD4+ T cells and decreased the ratio of Tregs without effecting CD8+ T cell status in the TME. In contrast, monotherapy with resiquimod markedly inhibited the growth of SCCVII. Histological examination at an earlier time point showed an accelerated infiltration of mononuclear cells in the TME. Our results suggest that the status of TME greatly affects the efficacy of resiquimod. Resiquimod shows considerable promise for cancer immunotherapy for some selected tumors. (Non-member collaborators; Lixin Li and Walter Lau, Birdie Biopharmaceuticals, PRC)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-112 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛構成タンパク質 Mfa4 のプロセッシングに関する研究

○長谷川義明, 永野 恵司, 吉田 康夫, 吉村 文信

愛院大 歯 微生物

【目的】歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛は, Mfa1 が重合した繊維構造物に, Mfa3, Mfa4 および Mfa5 が, アクセサリー分子として結合した構造をしている. アクセサリー分子の線毛形成における役割については, 十分には解明されていない. 我々は, 線毛結合型 Mfa4 は, N 末端から 53 番目の R (R53) まで消化されていることを明らかにしている. これは, Mfa4 の線毛への組込みには, 本菌の主要病原因子であるジンジパイン (トリプシン様プロテアーゼ, R と K の前を切断) による, N 末端領域のプロセッシングが必要であることを示唆する. 本研究では, Mfa4 の N 末端領域に存在する R にアミノ酸置換を導入した変異株を作製し, 線毛への組込みに及ぼす影響について検討した. 【方法】Mfa4 の R53 を A あるいは K に置換した R53A および R53K を発現する *P. gingivalis* 変異株を作製した. さらに, R50A/R53A 二重置換株を作製した. 線毛はイオン交換クロマトグラフィーにより精製した. Mfa4 の検出はウェスタンブロット法にて行った. 各変異 Mfa4 の N 末端アミノ酸配列を決定した. 【結果および考察】R53K, R53A および R50A/R53A 置換株の Mfa4 は, いずれも線毛に組込まれていたが, N 末端領域は, それぞれ, K53, R50 および K44 で切断されていた. したがって, Mfa4 は, 本来の R53 より上流の K44 で切断された場合でも線毛に組込まれること, また, R と K のいずれも消化され得ることが示された. 一方, R50A/R53A 株の菌体内には, 前駆体と考えられる Mfa4 が検出された. これは, この変異 Mfa4 のプロセッシング効率の低下を示し, さらに, Mfa4 が線毛に組込まれるには, N 末端領域がある程度消化される必要があることを示唆する.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

A study on processing of the Mfa4 accessory protein of Mfa1 fimbriae in periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*

○Hasegawa Y, Nagano K, Yoshida Y, Yoshimura F

Div Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Porphyromonas gingivalis expresses Mfa1 fimbriae, which are composed of polymer of Mfa1. Mfa3, Mfa4 and Mfa5 are incorporated into fimbriae as accessory proteins. We have revealed that N-terminus of Mfa4 was cleaved at arginine 53 (R53), suggesting that Mfa4 was processed by gingipains. In this study, we constructed point mutants on R in N-terminal region of Mfa4, and examined influence to their incorporation. The mutants on R53 to alanine (A) (R53A) and to lysine (K) (R53K), and double mutant of R50A/R53A were constructed. Whole-cell lysate (WCL) and the purified fimbriae were prepared from each strain. Mfa4 was detected by immunoblotting. The incorporated Mfa4 was analyzed by N-terminal sequencing. Mfa4 was incorporated into fimbriae of R53K and R53A, and R50A/R53A. However, N-terminal regions of R53K and R53A, and R50A/R53A were cleaved at K53, R50, and K44, respectively. These data suggested that Mfa4 could be integrated into fimbriae cleaved at R50 and K44, and K53, instead of R53, could be used for processing of Mfa4. A possible precursor form of Mfa4 was detected in WCL from R50A/R53A, suggesting that R50A/R53A mutations lead to reduction of processing efficiencies, in addition, processing of N-terminus of Mfa4 is required to incorporation of Mfa4 into fimbriae.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-113 *Porphyromonas gingivalis* における ATP 産生に関する phosphotransacetylase および acetate kinase の酵素学的解析

○吉田 康夫¹, 佐藤 満成^{1,2}, 毛塚雄一郎³, 長谷川義明¹, 永野 恵司¹, 吉村 文信¹

¹愛院大 歯 微生物

²愛院大 歯 有床義歯

³岩医大 薬 構造薬学

【目的】 歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* は糖非発酵性であり、アミノ酸を炭素源として短鎖脂肪酸を培養上清中に放出しながらエネルギーを得る。phosphotransacetylase は短鎖脂肪酸の産生過程において合成された acetyl-CoA と無機リン酸を基質にして acetyl phosphate を産生する。さらに acetate kinase によって、acetyl phosphate は ADP と反応して、ATP と酢酸を合成する。同菌において、これらの酵素は必須であることが示唆されているが、それらの酵素の分子生物学的な解析は報告されていない。本研究では、上記の反応に関する 2 種類のタンパク質の酵素学的性質を明らかにした。【方法】 データベース上で、*P. gingivalis* ATCC 33277 株において、acetate kinase および phosphotransacetylase と予測されている PGN_1178 および PGN_1179 を pGEX-6p-1 ベクターを用いて組換えタンパク質を精製した。PGN_1179 の反応速度は反応副産物である CoA を 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) と反応させ、吸光度計にて測定した。また、PGN_1178 の反応速度は産生された ATP を消費させて測定した。【結果】 PGN_1179 の K_m 値は 0.737 ± 0.129 mM, k_{cat} 値は、 1387 ± 269.5 s⁻¹であった。一方、PGN_1178 は ping-pong bi-bi にて反応が進むことが明らかとなり、acetyl-phosphate に対して K_m 値は 0.177 ± 0.0512 mM, k_{cat} 値は、 435.5 ± 32.2 s⁻¹, ADP に対して K_m 値は 0.585 ± 0.192 mM, k_{cat} 値は 421 ± 159.6 s⁻¹であった。また、PGN_1178 の反応における最適 pH は 8.0 で、Mn イオンまたは Mg イオンが反応に必要であった。【考察】 PGN_1178 および PGN_1179 の機能が実験的に証明された。既知の acetate kinase は反応に Mg イオンを特異的に要求したが、PGN_1178 は、Mg イオンより Mn イオン存在下において酵素反応が速かったことより、同タンパク質の立体構造が既知のものと異なることが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Enzymatic characterization of phosphotransacetylase and acetate kinase associated with biosynthesis of ATP in *Porphyromonas gingivalis*

○Yoshida Y¹, Sato M^{1,2}, Kezuka Y³, Hasegawa Y¹, Nagano K¹, Yoshimura F¹

¹Div Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

²Div Partial Denture, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

³Dept Structural Biol, Aichi-Gakuin Univ Sch Pharm

In *Porphyromonas gingivalis*, acetyl-phosphate is produced from acetyl-CoA by phosphotransacetylase. The reaction of acetyl phosphate with ADP by acetate kinase appeared to result in production of ATP. The molecular biological evaluation for the enzymes has not been reported. The recombinant PGN_1178 and PGN_1179 proteins were purified using pGEX-6P-1. The initial velocity of PGN_1179 (phosphotransacetylase) was determined by measuring CoA coupled with 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) at 412 nm. The initial velocity of PGN_1178 (acetate kinase) was determined by measurement of ATP. After the molecule was reacted with glucose, hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and NADP, NADPH was spectrophotometrically quantified at 340 nm. The K_m and k_{cat} values of PGN_1179 were 0.737 ± 0.129 mM and 1387 ± 269.5 s⁻¹, respectively. In contrast, the enzyme of PGN_1178 functions via a ping-pong bi-bi reaction. The K_m and k_{cat} values of PGN_1178 for acetyl phosphate were 0.177 ± 0.0512 mM and 435.5 ± 32.2 s⁻¹, respectively, whereas the K_m and k_{cat} values for ADP were 0.585 ± 0.192 mM and 421 ± 159.6 s⁻¹, respectively. The optimal pH for PGN_1178 was 8.0, and the favorable divalent metals were Mg²⁺ and Mn²⁺. The current study experimentally proved that PGN_1178 and PGN_1179 proteins function as acetate kinase and phosphotransacetylase, respectively.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-114 *Porphyromonas gingivalis* のアミノ酸及びオリゴペプチド輸送系の解析

○根本 優子, 小早川 健, 馬場 友巳, 根本 孝幸

長大 院医歯薬 口腔分子生化

【目的】 歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は糖非発酵性で, アミノ酸を炭素源・エネルギー源とする. 我々はこれまでアミノ酸取込に密接に関わる複数のジペプチジルペプチダーゼ (DPP) を発見し報告してきたが, 現在のところ本菌のジペプチド取込系は明らかになっていない. 本研究では, *P. gingivalis* のアミノ酸輸送系を明らかにすることを目的とし, また, 輸送系とジペプチド産生系との関連について検討した.

【方法】 *cep* 遺伝子断片を既知 (SstT), 及び 2 種類の推定オリゴペプチド輸送タンパク質 (OPT, POT) 遺伝子に挿入し遺伝子破壊株を作成した. レサズリン還元力の経時測定によりアミノ酸, 及びオリゴペプチドの取込を評価し, また, 各トランスポーター遺伝子破壊株の増殖能を測定した. MCA-ペプチド基質を用いてペプチダーゼ活性を測定した.

【結果と結論】 トランスポーター遺伝子破壊株の増殖は野生株より低下し, 特に POT 欠失株では著明な増殖遅延が認められた. 既報 (Takahashi & Sato, 2002) に一致して, レサズリン還元力の測定からも野生株ではジペプチド (Gly-Gly, Gly-Ser, Gly-Gln) の取込活性がもっとも高いことが示された. アミノ酸 (Leu, Gly, Ser) の取込はその 30-40% であり, トリペプチド (GGG, GGP) 取込はジペプチド取込の 30% 以下であった. Ac-Gly-Leu, 及び 6-12 オリゴペプチドの取込は極めて低かった. 以上から, *P. gingivalis* では主にジペプチドとしてアミノ酸が取込まれ, アミノ酸取込における DPP 活性の重要性が確認された. さらに欠失株の測定から, 本菌では少なくとも 3 種類のトランスポーターが機能していること, また, 今回検討したジペプチドは主に POT を介して取込まれることが明らかとなった. これらのトランスポーター欠失株では, Kgp, Rgp, 及び DPP11 の著明な活性上昇を認めたことから, エネルギー供給を補償する遺伝子発現調節系の存在が推定された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Amino acid and oligopeptide transporters in *Porphyromonas gingivalis*

○Ohara-Nemoto Y, Kobayakawa T, Baba T, Nemoto T

Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Porphyromonas gingivalis, a periodontopathic asaccharolytic bacterium, utilizes amino acids as carbon and energy sources. We have previously reported the activity of dipeptidyl peptidases (DPP), which are closely related to amino acid incorporation. In this report, the genes encoding SstT, and putative oligopeptide transporters (OPT and POT) were disrupted to study the amino acid transport system. These gene-disrupted strains were prepared by insertion of the *cep* gene fragment into the respective genes. Amino acid incorporation was evaluated by resazurin-reduction analysis. Bacterial growth was measured, and peptidase activities (gingipains and DPPs) were measured by using MCA-peptides. Bacterial growth was markedly reduced in the transporter-KO strains, especially Δ POT. Amounts of incorporation of Leu, Gly, and Ser were approx. 30-40% of those of dipeptides (Gly-Gly, Gly-Ser, Gly-Gln), and incorporation of tripeptides (GGG, GGP), Ac-Gly-Leu, and hexa- and dodeca-oligopeptides was significantly low. Amino acid-incorporation analysis demonstrated that these transporters actually function, and that POT may be the most functional dipeptide-transporter in the bacterium. Furthermore, the finding that the activities of Kgp, Rgp, and DPP11 appeared to be up-regulated in the KO strains strongly suggested the existence of a network involving expression of these peptidase genes to control the energy supply in *P. gingivalis*.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-115 *Porphyromonas gingivalis* 由来放射性同位元素標識 lipopolysaccharide の調製

○戸円 智幸¹, 橋本 修一², 深田 哲也¹, 藤田美也子³, 倉治竜太郎³, 伊藤 弘³, 沼部 幸博³

¹日歯大 生命歯 共同研 アイソトープ研究施設

²日歯大 生命歯

³日歯大 生命歯 歯周病

【目的】 歯周病の原因菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) が持つ lipopolysaccharide (LPS) は、歯周炎を引き起こす主な原因と考えられている。今回我々は、*P.g*-LPS の体内動態を解明するため、*P.g* から放射性同位元素標識 LPS を生合成し、精製することを試みた。**【方法】** 本研究には *P.g* の菌株、W83 を用いた。菌株は、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hemin, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ menadione を添加した Brain Heart Infusion または Soybean Casein Digest 液体培地中で、嫌氣的条件下 37 °C, 48 時間培養した。*P.g* からの LPS の抽出には、熱フェノール (Westphal) 法あるいはフェノール/クロロホルム/石油エーテル (PCP) 法を用いた。一方、*P.g*-LPS の標識には、上記培地に ³H-sodium acetate, ¹⁴C-N-acetyl glucosamine を添加し、同条件で培養し生合成を行った。精製した標識 LPS の純度は、エンドトキシン試験法、および SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) の銀染色像、オートラジオグラムにより確認した。**【結果と考察】** *P.g* の乾燥菌体 100 mg から得られた LPS は、それぞれ Westphal 法で 3.69 mg, PCP 法で 0.95 mg であり、Westphal 法の方が回収率が高かった。また、精製された LPS の SDS-PAGE を銀染すると、両抽出法に差はなく 12 kDalton 付近にラダーバンドとして検出された。これらの結果から放射性同位元素標識 *P.g*-LPS の抽出には、Westphal 法を用いた。最終的に得られた標識 LPS の比活性は、³H: 40.8 kBq/mg, ¹⁴C: 0.305 kBq/mg であった。放射性同位元素標識 LPS の SDS-PAGE 像をオートラジオグラフィで解析すると、銀染色バンドと一致し、*P.g*-LPS 分子内に放射性同位元素が組み込まれていることが明らかになった。本法により放射性同位元素標識 *P.g*-LPS が調製できた。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Preparation of the radiolabeled lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*

○Toen T¹, Hashimoto S², Fukada T¹, Fujita M³, Kuraji R³, Ito H³, Numabe Y³

¹Sect Radioisotopes Res, Res Center for Odontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

²Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

³Dept Periodontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Purpose: It has been supposed that lipopolysaccharide (LPS) from *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) that is one of the periodontopathic bacteria may cause periodontal disease. In order to evaluate pharmacokinetics of *P.g*-LPS, we attempted to extract and purify the radio-labeled LPS generated from *P.g*, in this study.

Materials & Methods: *P.g* (strain W83) was cultured in 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hemin, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ menadione, and Soybean Casein Digest medium in the presence of ³H-sodium acetate and ¹⁴C-N-acetyl glucosamine at 37° C for 48 hr under anaerobic condition. The radio-labeled LPS was extracted and purified from the dried *P.g* by the Westphal method. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of the labeled LPS was stained with the silver staining method and the autoradiography of the SDS-PAGE was performed. **Result & Conclusion:** The purified LPS of 3.69 mg was obtained from 100 mg of the dried *P.g* by the Westphal method. The specific radioactivity of LPS was ³H; 40.8 kBq/mg and ¹⁴C; 0.305 kBq/mg. The silver-stained ladder bands of LPS on the SDS-PAGE were detected in the vicinity of 12 kDalton and were consistent with the autoradiogram bands. Using this preparation method, the radio-labeled and purified LPS was obtained from *P.g*.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-116 揮発性硫化物産生における *Porphyromonas gingivalis* のトリプシン様酵素の役割

○平嶺 浩子¹, 渡辺 清子², 熊田 秀文³, 浜田 信城²

¹神歯大 院歯 高度先進口腔医

²神歯大 院歯 口腔科学

³神歯大 院歯 歯学教育

【目的】口臭は主に口腔内細菌の代謝によって産生される揮発性硫化物 (VSCs) に由来することが知られており, トリプシン様酵素 (gingipains) 活性を有している *Porphyromonas gingivalis* は, 主要な硫化水素 (H₂S) およびメチルメルカプタン (CH₃SH) の産生細菌であることが報告されている. 本研究では, *Porphyromonas gingivalis* のトリプシン様酵素の VSCs 産生性における役割について検討した. 【材料と方法】供試菌株は *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (親株) および gingipains 不活化株である KDP129 (*kgp*⁻), KDP133 (*rgpA*⁻ and *rgpB*⁻), KDP136 (*rgpA*⁻, *rgpB*⁻ and *kgp*⁻) 株を用いた. VSCs 産生量は, 試験管中の液体培地 3 ml に供試菌株を添加し, パラフィンで密封後 37°C で保温し, 気相部分の VSCs 量を経時的にガスクロマトグラフィーを用いて測定した. VSCs 産生量に対するトリプシン様酵素の影響は, トリプシン阻害剤である PMSF (1 mM), TLCK (100 μM) および *P. gingivalis* 由来 gingipain に対する鶏卵抗体 (IgY-GP) を添加することにより検討した. 【結果と考察】 *P. gingivalis* ATCC 33277 による CH₃SH 産生量は, 培養後 1 時間後から明らかな産生が認められたが, *kgp* 不活化株である KDP129 および KDP136 による CH₃SH 産生量は親株と比較して減少していた. トリプシン阻害薬の添加により H₂S および CH₃SH 産生量は減少し, さらに IgY-GP 添加では濃度依存的に CH₃SH 産生量の減少が認められた. 以上の結果から, *P. gingivalis* のトリプシン様酵素は VSCs 産生に重要な役割を果たすことが示唆された. 【利益相反】利益相反状態にはありません.

Roles of *Porphyromonas gingivalis* gingipains to produce volatile sulfur compounds

○Hiramine H¹, Watanabe K², Kumada H³, Hamada N²

¹Dept Highly Adv Stomatol, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

²Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

³Dept Dent Educ, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

Purpose: To examine the roles of *P. gingivalis* gingipains (RgpA, RgpB and Kgp) in volatile sulfur compounds (VSCs) production. **Materials and Methods:** The wild-type *P. gingivalis* ATCC 33277 strain, KDP129 (*kgp*⁻), KDP133 (*rgpA*⁻ and *rgpB*⁻) and KDP136 (*rgpA*⁻, *rgpB*⁻ and *kgp*⁻) were used in this study. The VSCs production by *P. gingivalis* strains from 20% human serum and BHI broth culture were measured using a gas chromatography. In brief, three ml of bacterial culture was sealed and incubated at 37°C for various hours and the headspace air was measured for VSCs production. To confirm the roles of proteolytic enzymes in VSCs production, inhibitory effects of trypsin inhibitor or yolk anti-gingipain antibody was added to the bacterial culture and the levels of VSCs were examined. **Results and Conclusion:** Both KDP129 and KDP136, the Kgp-deficient mutants, significantly reduced CH₃SH production from human serum and BHI broth compared to wild-type strain. The CH₃SH level in *P. gingivalis* ATCC 33277 culture was remarkably increased after 3 hours incubation. Adding trypsin inhibitors and yolk anti-gingipain antibody to the culture showed significant reduction of CH₃SH level. These results suggest that trypsin-like enzyme of *P. gingivalis* play an important role in VSCs production. **Conflict of Interest:** The authors declare no competing interests.

P2-117 *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生に関する Succinyl-CoA 還元酵素の構造機能解析

○毛塚雄一郎¹, 吉田 康夫²

¹岩医大 薬 構造生物

²愛院大 歯 微生物

【目的】 *Porphyromonas gingivalis* は多量の短鎖脂肪酸を培養上清中に放出する。短鎖脂肪酸の一種である酪酸は、歯周組織への為害作用があり、歯周病に起因する口臭の原因物質のひとつとしても知られている。歯周病患者の口腔内で検出される酪酸の濃度は、健常者に比べ顕著に高いことから、歯周病のマーカーとしての有用性が示唆されている。しかし、酪酸合成経路やそれに関与する個々のタンパク質の詳細な解析は十分にはなされていない。本研究では、酪酸合成経路に関わるタンパク質 Pgn_0723 の分子生物学的および酵素学的解析を実施するとともに X 線結晶構造解析を試みた。【方法】 *P. gingivalis* ATCC 33277 株の *pgn_0723* 遺伝子欠損株を作製し、培養上清中の短鎖脂肪酸量を GC-MS で定量した。リコンビナントタンパク質として調製した Pgn_0723 を用いて、各種基質存在下での酵素活性を NADH の消費を指標として測定した。さらに、結晶化の初期スクリーニングにより得られた結晶より X 線回折強度データを収集し、構造解析を行った。【結果と考察】 *pgn_0723* 遺伝子欠損株の培養上清に含まれる酪酸、イソ酪酸およびイソ吉草酸量は野生株と比較して有意な低下が見られた一方で、プロピオン酸量に変化はほとんどなかった。Pgn_0723 は Succinyl-CoA と NAD(P)H 存在下で Succinyl semialdehyde を生成する Succinyl-CoA 還元酵素と同定された。結晶構造解析の結果、基質の結合に関与すると考えられる部位の空間位置は乱れており、高い柔軟性を持つことが考えられた。また、Pgn_0723 は二量体が三量体化した類縁酵素では見られない六量体構造を取っていた。(会員外共同研究者: 岩手医科大学薬学部野中孝昌)

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Structure and function analyses of succinyl-CoA reductase involving butyrate production in *Porphyromonas gingivalis*

○Kezuka Y¹, Yoshida Y²

¹Dept Struct Biol, Iwate Med Univ Sch Pharm

²Div Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Porphyromonas gingivalis releases a large amount of short chain fatty acids (SCFAs) in the culture supernatant. Butyrate, one of SCFAs, is known to be toxic to oral tissue and a causative substance of oral malodor. Since butyrate concentration detected in periodontal pockets of patients with severe periodontitis was higher than that of healthy subjects, the molecule is suggested to be a possible clinical marker. However, the butyrate-producing pathway in *P. gingivalis* and proteins responsible for the production has not been fully elucidated. A Pgn_0723-deficient mutant of *P. gingivalis* was constructed, and the amount of SCFAs in the supernatant was quantified using GC-MS. Recombinant Pgn_0723 was prepared and enzymatically characterized. In parallel, the enzyme was crystallized and its crystal structure was analyzed. Butyrate in the culture supernatant of the mutant was lower than that of the wild type. Pgn_0723 was identified as a succinyl-CoA reductase, which produces succinyl semialdehyde from succinyl-CoA in the presence of NAD(P)H. Two substrate-binding loops were disordered, indicating their flexibility. Pgn_0723 forms a hexamer (trimer of dimers), which is not seen in other related enzymes with known structures.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-118 *Porphyromonas gingivalis* ECF シグマ因子変異株における菌体表層性状の解析

○菊池有一郎^{1,2}, 国分 栄仁^{1,2}, 柴山 和子¹, 大原 直也³, 中山 浩次⁴, 石原 和幸^{1,2}

¹東歯大 微生物

²東歯大 口科研

³岡大 院医歯薬 口腔微生物

⁴長大 院医歯薬 口腔病原微生物

【目的】細菌の ECF シグマ因子は、菌体外の生活環境変化に応答し、菌体の環境ストレスからの回避に働く。歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* は 6 種の ECF シグマ因子を保有している。ECF シグマ因子の一部についてはジンジパインの輸送や酸化ストレス物質の消去等に関与するとの報告があるが、細胞壁の性状との関連性については十分に明らかにされていない。我々は本研究にて ATCC 33277 株を親株としたそれぞれの ECF シグマ因子の遺伝子挿入変異株の細胞壁性状解析を試みたので報告する。

【方法】*P. gingivalis* ATCC 33277 株を親株とし、各 ECF シグマ因子遺伝子内にエリスロマイシン耐性遺伝子カセットが挿入された変異株を homologous recombination により作製した。親株と ECF シグマ因子変異株を用い、赤血球凝集活性試験、自己凝集能試験、薬剤感受性試験、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。

【結果と考察】PGN_0274 変異株は、赤血球凝集活性試験にて凝集能を認めず、自己凝集能試験においても凝集能の顕著な低下が認められた。この現象はジンジパインの膜外輸送の低下が原因と考えられる。薬剤感受性試験の結果、テトラサイクリン、オフロキサシンに対する感受性に顕著な変化は認められなかったものの、アンピシリンに対する感受性は PGN_0274 変異株で増加、PGN_0450、PGN_1740 変異株で低下した。また、TEM による菌体表層構造の観察では、PGN_0274 変異株において vesicle 形成の増加と、細胞壁部分の厚みの低下が認められた。以上の結果より、*P. gingivalis* ECF シグマ因子 PGN_0274 は、菌体表層の病原因子であるアドヘジンや細胞壁の構造形成に影響を与えていることが明らかとなった。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Role of the ECF sigma factors in cell wall character in *Porphyromonas gingivalis*

○Kikuchi Y^{1,2}, Kokubu E^{1,2}, Shibayama K¹, Ohara N³, Nakayama K⁴, Ishihara K^{1,2}

¹Dept Microbiol, Tokyo Dent Coll

²Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll

³Dept Oral Microbiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

⁴Dept Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Purpose: *Porphyromonas gingivalis* has been recognized as a major pathogen in chronic periodontitis. In order to colonize the gingival crevice, *P. gingivalis* must regulate gene expression in response to the various extracellular changes. Some bacteria utilize sigma factor proteins of the extracytoplasmic function (ECF) subfamily. In this study, we have investigated the ECF sigma factors in *P. gingivalis* to determine their roles in maintain the normal outer membrane character.

Methods: Insertional mutagenesis was used to create *P. gingivalis* mutants lacking ECF sigma factors of strain ATCC 33277. Hemagglutination activities, autoaggregation activities, and antimicrobial susceptibility were measured in the wild type strain and the ECF sigma factor mutants. Vesicles and outer membrane structure were observed by the transmission electron microscopy.

Results and Conclusion: The PGN_0274 mutant showed no hemagglutination activity and much less aggregation. The PGN_0274 mutant displayed an increase susceptibility to ampicillin, while PGN_0450 and PGN_1740 mutants displayed reduced susceptibility to this antibiotic, compared with the wild type strain. TEM images revealed that PGN_0274 mutant formed numerous outer membrane vesicles at the cell surface. These results indicated that ECF sigma factor PGN_0274 is important for bacterial surface-associated activities, including autoaggregation, hemagglutination, vesicle formation and ampicillin susceptibility.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-119 PI3K/Akt 経路に対する *P. gingivalis* ジンジパインの役割

○中山 真彰^{1,2}, 内藤真理子³, 中山 浩次³, 大原 直也^{1,2}

¹岡大 院医歯薬 口腔微生物

²岡大 歯 先端研セ

³長大 院医歯薬 口腔病原微生物

歯周病原細菌の長期感染は慢性歯周炎を引き起こし、口腔機能の顕著な低下に繋がる。我々はこれまでに、*Porphyromonas gingivalis* が産生するプロテアーゼ “ジンジパイン” が、宿主細胞の生存・増殖、代謝などに重要な機能を持つ PI3K/Akt の活性を抑制することを示した。本研究では、ジンジパインによる PI3K/Akt 活性抑制が Akt の下流タンパク質の機能に及ぼす影響を調べた。*P. gingivalis* ATCC33277 株 (PgWT 株)、および *P. gingivalis* ジンジパイン完全欠損株 (PgMT 株) をヒト歯肉上皮細胞へ感染させ、Akt の下流タンパク質 proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40), Murine Double Minute 2 (MDM2), 4E binding protein (4EBP), p70 S6 kinase (p70S6K)/Ribosomal Protein S6 (RPS6) のリン酸化レベルを検討した。各タンパク質のリン酸化レベルは、各タンパク質特異的リン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティング法により評価した。PgWT 株の感染では PRAS40, MDM2, 4EBP のリン酸化の低下が認められたが、PgMT 株の感染ではそれらは認められなかった。p70S6K のリン酸化レベルはいずれの株の感染でも変化しなかった。一方、RPS6 のリン酸化レベルは、PgWT 株感染により上昇がみられ、Akt 経路の抑制とは異なるジンジパインによって活性化されるシグナル伝達経路の存在が示唆された。以上の結果から、*P. gingivalis* ジンジパインは Akt の活性抑制だけでなく、RPS6 のように Akt 経路以外の別経路を活性化しており、多様な作用機序が考えられた。今後、各タンパク質の生理的機能への影響とその意義を明らかにしていく。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The role of *P. gingivalis* gingipains on PI3 kinase/Akt signaling pathway

○Nakayama M^{1,2}, Naito M³, Nakayama K³, Ohara N^{1,2}

¹Dept Oral Microbiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

²ARCOCS, Okayama Univ Dent Sch

³Dept Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Porphyromonas gingivalis is a major pathogen of periodontal diseases, including periodontitis. We have previously reported that PI3K and Akt were inactivated by gingipains, and GSK3, mTOR, and Bad in PI3K/Akt signaling pathway were also dephosphorylated. Here, we have investigated the significance of *P. gingivalis* gingipains on PI3K/Akt signaling pathway in gingival epithelial cells. *P. gingivalis* (PgWT), but not a gingipain-deficient *P. gingivalis* mutant (PgMT), altered phosphorylation level of Akt downstream proteins, which are PRAS40, MDM2, 4EBP, and p70S6K/RPS6. PRAS40, MDM2, and 4EBP were dephosphorylated by gingipains in the cells infected with PgWT, but not in PgMT-infected cells. Neither PgWT nor PgMT could change the phosphorylation level of p70S6K. However, RPS6 phosphorylation was increased by gingipains under infection of PgWT, but PgMT did not change the phosphorylation level of RPS6. Interestingly, RPS6 is one of Akt substrates, and p70S6K and p90S6K are involved in RPS6 activation. It is likely that activation of RPS6 is independent of gingipains-induced PI3K/Akt inhibition, and that it might be associated with p90S6K activation. Taken together, our findings indicate that *P. gingivalis* gingipains have some effect on cellular signal transduction, leading to the destruction of epithelial barriers through the disturbance of cellular physiological functions.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-120 マウスにおける *Porphyromonas gingivalis* の硫化水素産生酵素による生体反応の解析

○塩屋 幸樹¹, 平岡 行博², 吉田 明弘¹

¹松歯大 口腔細菌

²松歯大 総歯研

【目的】 *Porphyromonas gingivalis* は LPS やジンジパインをはじめ多くの病原性因子を有する細菌であるが、硫化水素産生菌としても知られている。硫化水素は一酸化窒素や一酸化炭素に次ぐ第3のガス状情報伝達物質として注目されているが、同細菌が産生する硫化水素の生体への病原性は明らかになっていない。そこで、本研究は *P. gingivalis* における硫化水素産生酵素の同定およびマウス生体反応における同酵素の役割について解明することを目的とした。【方法】 *P. gingivalis* W83 菌体破砕液を用い、ゲルろ過にて硫化水素産生を示すタンパク質画分を分離した。さらに、N末端アミノ酸配列解析より、硫化水素産生酵素およびその遺伝子を同定した。また、*P. gingivalis* W83 を親株として硫化水素産生酵素欠損株（欠損株）を作製した。次に、*P. gingivalis* W83 親株と欠損株を8週齢のBALB/cマウスに接種し、致死率と炎症の程度を比較した。【結果】 まず、*P. gingivalis* W83 の菌体破砕液の硫化水素産生活性を示す画分を用いてN末端アミノ酸配列解析を行い、硫化水素産生酵素をコードするORFを同定した。本ORF欠損株の硫化水素産生能が欠失していたことより、この酵素が硫化水素産生に関与する唯一の酵素であることが示された。次に、BALB/cマウスに親株および欠損株を接種し、腹部の炎症および死亡率を比較した結果、欠損株で死亡率および炎症の程度が有意に低下した。このことより *P. gingivalis* において硫化水素産生遺伝子はマウスの炎症反応に関与することが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The effect of *Porphyromonas gingivalis* H₂S synthase on mouse inflammation

○Shioya K¹, Hiraoka Y², Yoshida A¹

¹Dept Oral Microbiol, Matsumoto Dent Univ

²Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ

P. gingivalis is known to produce hydrogen sulfide (H₂S). H₂S is considered to be one of the gasotransmitters and plays a vital role in physiological and pathological processes. Based on this background, the aim of this work is to identify the H₂S synthase in *P. gingivalis* and to investigate the effect of this enzyme on mouse inflammation. The enzyme involved in H₂S synthesis was screened from a disrupted *P. gingivalis* W83 cell suspension by gel filtration. N-terminal amino acid sequence analysis of the fraction showing H₂S production revealed the ORF coding of the H₂S synthase. The H₂S synthase inactivated strain (KO strain) did not produce H₂S, suggesting that this enzyme is the only H₂S synthase in *P. gingivalis*. WT and KO strains were subcutaneously injected into the back of mice, and levels of inflammation and mortality were monitored daily. The mean diameter of the abscesses formed following infection of KO strain was smaller than that of WT. Although the infection by WT led to the death of all mice, all the mice infected by KO strain were alive after 6 days. In conclusion, we identified the H₂S synthase in *P. gingivalis* and revealed this enzyme was crucial for mouse inflammation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-121 *P. gingivalis* 感染による p38/JNK を介したヒト胎盤栄養膜細胞のアポトーシス誘導

○稲葉 裕明¹, 天野 敦雄², 仲野 道代¹

¹岡大 院医歯薬 小児歯

²阪大 院歯 予防歯

【目的】これまでの疫学研究や動物実験から、歯周炎は早産および低体重児出生のリスクファクターであると示唆されている。また、妊婦の胎盤や羊水から歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* が検出されており、この原因の1つとして血行性経胎盤感染があげられている。我々は *P. gingivalis* の胎盤の栄養膜細胞への付着・侵入により、細胞のDNA損傷シグナルが活性化され、G1期での細胞周期停止が誘導され、細胞増殖を妨げられることを報告した。本研究では *P. gingivalis* の感染が、ヒト胎盤栄養膜細胞の p38 ならびに JNK シグナル伝達経路に及ぼす影響について解析を行った。【方法】*P. gingivalis* 33277 株をヒト絨毛膜外栄養膜細胞株 (HTR-8 細胞) に感染させ、細胞周期とアポトーシスを FACS により評価した。また p38 ならびに JNK シグナル伝達経路は、Western blot 法により解析した。【結果】*P. gingivalis* の感染により、p38 と JNK を介した熱ショックタンパク質 HSP27 のリン酸化が認められた。さらに、p38/HSP27 経路は p53 のリン酸化の影響を受けることも観察された。【考察】*P. gingivalis* の HTR-8 細胞への付着・侵入により、p38/JNK のシグナル伝達経路を介した細胞周期 G1 期停止やアポトーシスが誘導されることが示唆された。(会員外共同研究者: Richard J Lamont, University of Louisville (USA))

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Cell cycle arrest and apoptosis induced by *Porphyromonas gingivalis* requires JNK and p38 activation in human trophoblasts

○Inaba H¹, Amano A², Nakano M¹

¹Dept Pediatr, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

²Dept Prevent Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent

Objective: Epidemiological and interventional studies have revealed a close association between periodontal diseases and preterm delivery of low-birth-weight infants. *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogen, can translocate to gestational tissues following oral-hematogenous spread. We previously reported that *P. gingivalis* invades extravillous trophoblast cells (HTR-8) derived from the human placenta and activates cellular DNA damage signaling pathways that lead to G1 arrest and suppression of suppression. In the present study, we examined the effect of *P. gingivalis* infection on p38 and JNK pathways associated with cellular impairment. **Methods:** HTR-8 cells were incubated with *P. gingivalis* 33277 at an MOI of 200. Cell cycle and apoptosis were analyzed by FACS. The phosphorylation of the p38 and JNK pathways was investigated by western blotting. **Results:** Following *P. gingivalis* infection, p38 and JNK were found to be activated together with its downstream signaling molecule HSP27. Furthermore, small interfering RNA (siRNA) knockdown of p53 abrogated activation of both p38 and HSP27. **Conclusion:** Our results suggest that *P. gingivalis* activates the p38 and JNK pathways that lead to G1 arrest and apoptosis in trophoblast.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-122 *Prevotella intermedia* の産生する細胞外 nuclease の解析

○深町はるか, 森崎 弘史, 有本 隆文, 片岡 嗣雄, 桑田 啓貴

昭大 歯 口腔微生物

歯周病は、プラーク中の歯周病原細菌によって引き起こされる炎症性疾患であり、歯周病原細菌は、宿主の免疫を回避して定着し歯周病の病態の成立に関与していると考えられる。好中球細胞外トラップ (NETs) は、好中球の細胞死と共に放出される DNA やヒストンからなる網目状の細胞外構造体で病原微生物を捕捉し、排除する役割を担う自然免疫システムである。歯周病原細菌が最初に直面する歯肉上皮においてもこの NETs が形成されている。我々は、歯周病原細菌が細胞外に分泌する nuclease が NETs を構成する DNA を分解することで、宿主の免疫を回避し、細菌の定着を可能にしているのではないかと推測した。始めに歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の nuclease 産生能を調べたところ、*P. intermedia* の活性が非常に高いことを見出した。そこで、*P. intermedia* の nuclease homolog を検索したところ、2つの homolog が存在した。これら2つの nuclease homolog (*nucA*, *nucD*) の組換えタンパクを作製し、酵素学的性質および NETs 分解への関与を検討した。その結果、NucA, NucD は一本鎖 DNA, 二本鎖直鎖 DNA, 二本鎖環状 DNA, RNA を分解したことから、NucA, NucD 共に nuclease であることが明らかとなった。また、これらの nuclease 活性には Mg^{2+} と Ca^{2+} が必須であった。nuclease 活性は pH 5.5 から pH 8 の広い範囲で維持され、NucA の至適 pH は 6.0-6.5, NucD の至適 pH は pH 6.5-7.5 であった。さらに NucA, NucD はヒト好中球から誘導した NETs の分解活性を有することが明らかとなった。また *P. intermedia* での発現状態を調べたところ、これらの酵素は持続的に発現していることが分かった。以上の結果から、*P. intermedia* は nuclease 活性により NETs の防御機構を回避する可能性が示唆された。(会員外共同研究者：道家碧)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Characterization of extracellular nucleases from *Prevotella intermedia*

○Fukamachi H, Morisaki H, Arimoto T, Kataoka H, Kuwata H

Dept Microbiol Immunol, Showa Univ Sch Dent

Periodontitis is an inflammatory disease caused by periodontal bacteria in subgingival plaque. These bacteria are able to colonize the periodontal region by evading the host immune response. Neutrophils, the host's first line of defense against infection, use various strategies to kill invading pathogens, including neutrophil extracellular traps (NETs). NETs are extracellular net-like fibers made up of histones and DNA from neutrophils that disarm and kill bacteria extracellularly. Bacterial deoxyribonucleases (DNases) degrade NETs to escape NET killing. It has now been shown that extracellular DNases enable bacteria to evade this host antimicrobial mechanism, leading to increased pathogenicity. Here, we compared the DNase activity of major Gram-negative periodontopathogenic bacteria, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. We found that *Prevotella intermedia* showed the highest DNase activity. Genomic analysis of *Prevotella intermedia* revealed the presence of two genes, *nucA* and *nucD*, putatively encoding secreted DNases, although their enzymatic and biological activities are unknown. We cloned *nucA* and *nucD* encoding nucleases from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 and characterized their gene products. Recombinant NucA and NucD digested DNA and RNA, which required both Mg^{2+} and Ca^{2+} for optimal activity. In addition, NucA and NucD were able to degrade the DNA matrix comprising NETs.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-123 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* における small RNA の同定

○大貝 悠一, 小松澤 均

鹿大 院医歯 口腔微生物

歯周病原菌のひとつである *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* はロイコトキシンや細胞致死膨化毒素を有する毒素産生菌としても知られている。近年、病原性細菌において、病原性因子の発現調節制御を担う因子として、small RNA が注目されている。本研究では、*A. actinomycetemcomitans* HK1561 株を用い、small RNA の網羅的同定及びそれらの発現性を解析した。1% yeast extract 含有 Todd Hewitt Broth にて培養した対数増殖期の菌体より、低分子の RNA をターゲットとした RNA-seq を行った。得られた配列のうち、遺伝子間領域および遺伝子の逆鎖に発現が認められる領域を putative small RNA とした。100 以上の small RNA が同定され、その一部は増殖期依存にその発現性を変動させることが確認された。

会員外共同研究者：後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也 (九大 院医 細菌)

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Identification of small RNA in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

○Oogai Y, Komatsuzawa H

Dept Oral Microbiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

A periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is known as a toxigenic bacterium which produces leukotoxin and cytolethal distending toxin. Recently, small RNA has been focused on new regulatory factor for virulence genes in several pathogens. In this study, we performed the comprehensive identification of small RNA in *A. actinomycetemcomitans* strain HK1651 and investigated their expressions during growth. Total RNA was extracted from exponential phase cells grown in Todd Hewitt broth containing 1% yeast extract. Then, small RNA specific RNA-seq was performed. Based on the sequences obtained, we identified the small RNA with the criteria that RNA expression was found in intergenic or antisense region. As the result, we identified more than 100 putative small RNAs. Among small RNAs, some small RNAs showed the altered expression in growth dependent.

Non-member collaborator: Yasuhiro Gotoh, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi (Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-124 *Streptococcus ferus* cariogenic factor 遺伝子の検索

○桑原 紀子, 齋藤 真規, 續橋 治, 小林 良喜, 瀧澤 智美, 落合 智子
日大松戸歯 微生物免疫

【目的】 ヒト口腔に常在するミュータンス・レンサ球菌の系統発生的研究の一環として, 今回ミュータンス・レンサ球菌群の1菌種であり, ヒト歯の主要原因菌である *Streptococcus mutans* と同じ血清型cである *Streptococcus ferus* について, cariogenic factor であるグルコシルトランスフェラーゼ(GTF)およびグルカン結合タンパク(Gbp)遺伝子について検索を試みた.

【方法】 *S. ferus* 培養上清中の非水溶性グルカン合成能, ショ等依存性菌体固着能試験, デキストラン依存性凝集能, および抗GTF抗体による免疫染色は既報に準じて行った. GTFおよびGbpの遺伝子の検索はblast searchプログラムを用いて検索を行った.

【結果と考察】 *S. ferus* は培養上清中に非水溶性グルカン合成能, ショ等依存性固着能および, デキストラン依存性凝集能を *S. mutans* と比較すると弱いながらも有していた. 抗GTF抗体による免疫染色でも反応性は *S. mutans* に劣るものの, 明らかなバンドが確認された. またblast search検索では, GTFは *S. mutans* *gtfB* 遺伝子を, Gbpは *S. mutans* *gbpA-GbpD* の4遺伝子の配列を用いて行ったところ, GTFおよびGbpでホモログと考えられるORFが2個ずつ確認された. GTF遺伝子では *S. mutans* GTF-B(67%)およびGTF-D(69%)遺伝子と相同性を示し, GbpではGbpB(73%)およびGbpC(75%)遺伝子と相同性を示していた. GTFおよびGbpによる系統樹を作成したところ, GTFでは *S. ferus* は *S. mutans* よりも早く分岐しており, Gbpでは *S. ferus* と *S. mutans* は同じクラスターを形成していた. 以上の結果から, *S. ferus* は cariogenic factor であるGTFとGbpのホモログを保持していることが明らかとなった.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Analyses of cariogenic factor genes from *Streptococcus ferus*

○Shinozaki-Kuwahara N, Saito M, Tsuzukibashi O, Kobayashi R, Hashizume-Takizawa T, Kurita-Ochiai T

Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Objective: To investigate the phylogenetic affinities of streptococci, *Streptococcus ferus* was analyzed. It was supposed that *S. ferus* showed the abilities of water-insoluble glucan synthesis. In this study, two cariogenic factors genes, glucosyltransferases (GTF) and glucan binding proteins (Gbp) of *S. ferus* were examined to construct the phylogenetic trees based on GTFs and Gbps, respectively.

Methods: Enzymatic and antigenic analyses of the GTFs and dextran-dependent aggregation test of *S. ferus* were examined as previously described. Blast search was applied using *gtfB*, and *gbpA to GbpD* of *S. mutans*, respectively.

Results: Enzymatically and immunologically active GTF and slight dextran-dependent aggregation were found in *S. ferus*. Two GTF and two Gbp gene homologues were found in *S. ferus* by blast search. The corresponded amino acid sequences of GTFs exhibited 67 and 69% homologies to *S. mutans* GTF-C and GTF-D, respectively, and of Gbps indicated 73 and 75% similarities to *S. mutans* GbpB and GbpC, respectively. Phylogenetic trees showed that two GTFs of *S. ferus* diverged at an early branch in *S. mutans*, and two Gbps of *S. ferus* were clustered with *S. mutans*, respectively. These results suggested that *S. ferus* maintained homologue of GTF and Gbp genes.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-125 *Streptococcus sobrinus* の dextran-binding lectin AB 遺伝子変異の同定

○田村 晴希, 山田ありさ

岩医大 薬理 病態制御

【目的】*Streptococcus sobrinus* はデキストラン結合レクチン (Dbl) をコードする 2 つの遺伝子 *dblA*, *dblB* が同定されている。また, *S. sobrinus* 6715 株ではデキストラン結合レクチン B (DblB) がデキストラン凝集と最も関連することが知られている。我々はこれまでに, デキストラン依存性凝集を示さない *S. sobrinus* リファレンス株を 2 株見出した。そこで本研究では, それらの株の *dblAB* 遺伝子を調べることを目的とした。

【方法】*S. sobrinus* SL1 株と OMZ 65 株の *dblAB* 遺伝子領域を PCR 法で増幅し, その塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定した (GenBank: AB745048, AB820290)。

【結果と考察】塩基配列の解析結果から, SL1 株では *dblB* 遺伝子にナンセンス突然変異があり, p.Gln509Ter と推察された。また, OMZ 65 株では *dblA* 遺伝子と *dblB* 遺伝子に変異があり, *dblB* 遺伝子産物の機能喪失が予想された。これらの結果から, *S. sobrinus* デキストラン依存性凝集能には *dblB* 遺伝子産物の関与が他の菌株でも示唆された。共同研究者: 三浦廣行 (岩医大)

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Identification of mutations of *Streptococcus sobrinus* dextran-binding lectin AB genes

○Tamura H, Yamada A

Div Bioregulatory Pharmacol, Dept Pharmacol, Iwate Med Univ

Purpose: Dextran-binding lectin A and B genes, *dblA* and *dblB*, of *Streptococcus sobrinus* have been identified, and DblB is associated with dextran-induced agglutination in *S. sobrinus* strain 6715. In this study, we aimed to analyze nucleotide sequences of *dblA* and *dblB* genes of two laboratory strains, SL1 and OMZ 65, which fail to agglutinate by dextran.

Materials & Methods: Regions containing *dblA* and *dblB* genes were amplified by PCR, and nucleotide sequences were determined by direct sequencing (GenBank: AB745048, AB820290).

Results & Conclusion: Nucleotide sequence analysis showed that nonsense mutation of *dblB* gene of strain SL1 was found at position 509 (p.Gln509Ter) and that gene mutations were observed in *dblA* and *dblB* of strain OMZ 61, suggesting loss of function of the *dblB* gene product. These findings suggest that DblB may be associated with the dextran-dependent agglutination of *S. sobrinus* strains. Coworker: Hiroyuki Miura (Iwate Med Univ)

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-126 *Streptococcus oralis* 由来の過酸化水素はマクロファージのリソソームを傷害する

○岡橋 暢夫¹, 中田 匡宣², 桑田 啓貴³, 川端 重忠²

¹阪大 院歯 フロンティア先端

²阪大 院歯 口腔細菌

³昭大 歯 口腔微生物

【目的】 *Streptococcus oralis* はミテイス群に属する口腔レンサ球菌であり、時として心内膜炎や菌血症を引き起こすことが知られている。我々はこれまでに *S. oralis* 由来の過酸化水素がマクロファージや上皮細胞に細胞死を誘導することを報告してきた。本研究では *S. oralis* 感染によるマクロファージの細胞死誘導機構について解析を行った。

【結果と考察】 RAW 264 マクロファージ細胞株に *S. oralis* を感染させると細胞死が誘導された。過酸化水素産生欠損変異株では細胞死は見られず、本菌が産生する過酸化水素が細胞死を引き起こすことが確認された。感染細胞の細胞小器官を染色したところ、リソソームやミトコンドリアの傷害が観察された。リソソームの傷害を調べるために LysoTracker を用いて蛍光染色を行った結果、*S. oralis* 感染あるいは過酸化水素処理によってリソソーム内の pH が上昇し、その酸性環境が消失することが判明した。リソソーム特異的タンパク質である LAMP-1 を蛍光免疫染色した場合においてもリソソームの傷害を反映する染色像が観察された。この傷害は、細胞死に先だって起こることから、細胞死誘導の一因である可能性が考えられた。リソソームにはタンパク質や脂質を分解する様々な加水分解酵素が含まれている。これらの酵素がリソソームから遊離して細胞死を誘導する可能性を考え、代表的なリソソーム酵素のひとつであるカテプシン B について阻害剤の作用を検討した。その結果、細胞死そのものはさほど抑制されなかったものの、マクロファージが細胞死とともに培養プレート底面から剥離し浮遊する現象を阻害することが分かった。

これらの結果から、*S. oralis* 由来の過酸化水素によるマクロファージの細胞死には、リソソームの傷害が関与している可能性が示された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Streptococcus oralis induces lysosomal impairment of macrophages via bacterial hydrogen peroxide

○Okahashi N¹, Nakata M², Kuwata H³, Kawabata S²

¹Cent Frontier Oral Sci, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

³Dept Microbiol Immunol, Showa Univ Sch Dent

Streptococcus oralis is a member of the oral mitis group streptococci, and known to cause opportunistic infections such as bacterial endocarditis and bacteremia. Recently, we found hydrogen peroxide (H₂O₂) produced by *S. oralis* is sufficient to kill the human monocytes and epithelial cells, implying streptococcal H₂O₂ is a cytotoxin. In the present study, we investigated the effect of streptococcal H₂O₂ on lysosomes, organelles of the intracellular digestive system.

S. oralis infection induced the cell death of RAW 264 macrophages in an H₂O₂-dependent manner. Visualization of lysosomes with LysoTracker revealed lysosome deacidification after infection of *S. oralis* or exposure to H₂O₂. Similarly, fluorescent labeling of lysosome-associated membrane protein-1 gradually disappeared during infection of *S. oralis* or exposure to H₂O₂. We investigated cathepsin release from lysosomes, because lysosomal cathepsins are reported to be involved in the lysosome-associated cell death. Fluorescent staining of cathepsin B suggested the leakage of cathepsin B from damaged lysosomes. However, treatment with a specific inhibitor of cathepsin B had negligible effects on cell death; instead, it suppressed the detachment of dead cells from the culture plates. These results suggest that streptococcal H₂O₂ induces cell death with lysosomal destruction.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-127 環境温度の変化に対する肺炎球菌の適応と血中における菌体生存の関連

○中田 匡宣, 住友 倫子, 山口 雅也, 川端 重忠

阪大 院菌 口腔細菌

肺炎球菌は生息部位である上気道に局所性の病態を起こすだけでなく、血流を介する全身伝播により髄膜炎や敗血症などの侵襲性疾患を惹起する。本菌は全身へ感染を拡大させる際、温度変化を伴う環境の遷移を感知するとともに、病原因子の産生を調節し病態を惹き起こす可能性が考えられる。本研究では、環境温度の変化が肺炎球菌の血中での生存に及ぼす影響について検討した。通常の培養温度である 37°C もしくは低温として 28°C で対数増殖期まで培養した血清型 4 型の TIGR4 株を 5 週齢の CD1 マウスの尾静脈から感染させ、経時的に採血を行った。感染 12 時間後の血中における菌体生存率は、低温での前培養により低下した。ヒト末梢血を用いた殺菌試験においても同様の傾向が認められたことから、肺炎球菌は環境温度の上昇を感知し、血中での生存に有利な表現型に変化することが示唆された。一方、肺胞上皮細胞株である A549 細胞への菌体付着量は低温での菌体培養により増加したことから、環境温度の上昇に伴う付着因子発現量の低下が推察された。次に、各培養温度で生育させた菌体から培養上清画分と菌体表層画分を調製し、分泌タンパクの構成を比較した。質量分析による解析から、培養温度により分泌量が変化するタンパク質としてエノラーゼを含む複数種が挙げられた。抗エノラーゼ抗血清を用いた解析から、菌体表層へのエノラーゼ分泌量は培養温度の上昇とともに増加することが確認された。また、菌体表層のエノラーゼはプラスミノゲンとの結合能を有し、免疫回避や組織侵襲に関与することから、肺炎球菌のプラスミノゲン結合能を検討した。その結果、培養温度の上昇に伴い、菌体へのプラスミノゲン結合量は増加した。以上の結果から、肺炎球菌は炎症に伴う環境温度の上昇とともにエノラーゼなどの病原因子の分泌量を変化させ、血流侵入後の宿主免疫による殺菌を抑制することが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。**Pneumococcal adaptation to environmental temperature shift impacts survival in blood**

○Nakata M, Sumitomo T, Yamaguchi M, Kawabata S

Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive pathogen responsible for a variety of mucosal infections and invasive diseases, including meningitis and sepsis. When systemically disseminated from its niche, this organism is thought to sense environmental changes and modulate its expression of virulence factors. We examined whether the temperature of culture used to grow *S. pneumoniae* had effects on later survival in blood. *S. pneumoniae* strain TIGR4 (serotype 4) was grown to the exponential phase at either 37°C or 28°C, then used to intravenously infect CD1 mice. Whole blood samples obtained at 12 h after infection showed that the survival of bacteria grown at 37°C was higher as compared to those grown at 28°C. Conversely, *S. pneumoniae* grown at the lower temperature showed increased bacterial adherence to A549 cells. Among the differentially expressed proteins in culture fractions of TIGR4 grown at 37°C and 28°C, extracellular enolase was increased at the higher temperature. Since surface-displayed enolase promotes plasminogen binding, resulting in immune evasion, a whole-cell plasminogen binding assay was conducted, which showed more efficient binding to bacteria grown at 37°C. Our findings indicate that *S. pneumoniae* senses the surrounding temperature and modulates its expression of extracellular enolase to promote survival in blood.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-128 *Streptococcus pneumoniae* 培養上清はインフルエンザウイルスの感染拡大に働く

○神尾 宜昌, 落合 邦康, 今井 健一

日大 歯 細菌

インフルエンザウイルスは新たに合成されたウイルス粒子と感染細胞のレセプターが結合しているため、細胞外に放出されない。そこで、複製されたウイルス粒子表面のノイラミニダーゼ(NA)により結合が切断され、細胞から細胞外へと放出される。一部の細菌はNAを産生することが報告されており、われわれは口腔細菌が産生するNAがインフルエンザウイルスの感染拡大に働くことを明らかにした。口腔細菌より高いNA活性を認める肺炎球菌は、インフルエンザと混合感染もしくは二次感染により重症化することが知られており、特に高齢者においては死に至ることも少なくない。そこで本研究では肺炎球菌の培養上清がインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響を検討した。肺炎球菌培養上清を添加しMDCK細胞を用いてウイルス感染を行った結果、ウイルス放出量および感染細胞が著しく増加した。つぎに、肺炎球菌培養上清とともにウイルスをマウスに感染させた。その結果、ウイルス感染群において体重の減少が認められ、肺炎球菌培養上清とともに感染させた群では大幅な体重の減少が認められた。一方、培養上清のみの場合では、体重の変動が認められなかった。肺のウイルス量をプラーク法により測定した結果、肺炎球菌培養上清とともにウイルス感染したマウスでは、上清を伴わないウイルス感染群に比べ、ウイルス量が有意に増加した。以上の結果から、肺炎球菌がインフルエンザウイルスの感染を拡大することが明らかとなった。肺炎球菌はNAを産生することから、培養上清中の肺炎球菌由来のNAが感染拡大に働いている可能性が考えられる。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

***Streptococcus pneumoniae* supernatants may contribute to influenza A virus infection**

○Kamio N, Ochiai K, Imai K

Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent

Influenza A virus (IAV) and *Streptococcus pneumoniae* are two major upper respiratory tract pathogens responsible for exacerbated diseases in coinfecting individuals. The aim of the current study was to determine whether *S. pneumoniae* culture supernatant treatment in MDCK cells and, subsequently, in mice affects IAV replication. In MDCK cells, *S. pneumoniae* culture supernatant promoted IAV release and cell-to-cell spread of the infection. Moreover, C57BL/6J mice inoculated with both *S. pneumoniae* culture supernatant and IAV suspension, and monitored for changes in body weight for 3 days showed reduced weight loss compared to mice inoculated with IAV suspension. Additionally, viral titers were obtained in the lungs of virus-infected mice 3 days post-treatment, which showed increase viral titers compared to mice inoculated with only IAV suspension. These findings suggest that *S. pneumoniae* culture supernatant could elevate the risk and exacerbate IAV infection.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-129 口腔における *Actinomyces* 優勢菌の分離と同定方法の確立

○内堀 聡史¹, 續橋 治², 小林 平¹, 會田 雅啓¹

¹日大松戸歯 クラウンブリッジ

²日大松戸歯 微生物免疫

【目的】*Actinomyces* 属菌は歯面のバイオフィルム形成初期において中心的な役割を果たしている。近年、次世代シーケンス解析を用いた研究で、本属菌が健常な歯周組織で優勢であると報告されている。*Actinomyces* 属菌の中で、*A. naeslundii*, *A. oris* および *A. odontolyticus* が口腔において優勢な *Actinomyces* 属菌 (OPA) であると考えられている。しかしながら、OPA の分布に関する詳細な報告はない。そこで、本研究では OPA の分離法と Multiplex PCR を用いた同定法を確立することを目的とした。【方法】 選択培地を開発するために、基礎培地の検討と薬剤感受性試験による抗菌薬の選択を行った後、選択培地の組成を決定した。培地を作製し、OPA を含む代表的な口腔細菌の回収率を調査した。16S rDNA 塩基配列に基づいて菌種特異的プライマーを設計した。本選択培地を用いて被験者 20 名から集めた歯垢試料中の OPA の割合を調べた。【結果と考察】 OPA は選択培地上で良好な発育を示し、それ以外の代表的な口腔細菌の発育は、著しく阻害された。すべての被験者の歯垢試料において OPA は検出され、最も主要な菌種は *A. oris* であった。これらの結果から、本研究の OPA の分離法と Multiplex PCR を用いた同定法が有用であることが推察された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Isolation and identification methods of oral predominant *Actinomyces* species

○Uchibori S¹, Tsuzukibashi O², Kobayashi T¹, Aida M¹

¹Dept Crown Bridge Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

²Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Objective: *Actinomyces* species play a central role in the initial stages of biofilm formation on teeth. These organisms were overrepresented in the healthy gingival condition by next generation sequencing technologies recently. It is considered that among them, *A. naeslundii*, *A. oris* and *A. odontolyticus* are oral predominant *Actinomyces* species (OPA). The distribution of OPA has never been reported. The aim of this study was to establish the isolation and identification methods using Multiplex PCR of OPA. **Methods:** To develop the selective medium for the isolation of OPA, following the selections of the base medium and antibiotics, the growth recoveries of representative oral bacteria including OPA were examined. PCR primers were designed based on partial sequences of the 16S rDNA. The proportion of OPA in dental plaque samples collected from 20 subjects was examined. **Results and Conclusion:** The growth of representative oral bacteria except for OPA was remarkably inhibited on the selective medium. Multiplex PCR reacted to *A. naeslundii*, *A. oris* and *A. odontolyticus*, respectively. OPA was detected in dental plaque samples of all subjects, and the most predominant species among OPA was *A. oris*. These results indicated that the isolation and identification methods of OPA in this study were useful.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-130 *Actinomyces israelii* の分離用選択培地の開発とその口腔内分布

○續橋 治¹, 内堀 聡史², 齋藤 真規¹, 小林 良喜¹, 瀧澤 智美¹, 桑原 紀子¹,
落合 智子¹

¹日大松戸歯 微生物免疫

²日大松戸歯 クラウンブリッジ

【目的】 *Actinomyces israelii* は放線菌症の主要な起因菌と考えられており、インプラント周囲炎などの他の口腔感染症においても分離される。*A. israelii* はヒト口腔から分離されるが、本菌の分布に関する詳細な報告はほとんどない。そこで、我々は *A. israelii* の分離用選択的培地を開発し、口腔における本菌の分布を調査した。【方法】 選択培地を開発するために、基礎培地の検討と薬剤感受性試験による抗菌薬の選択を行った後、選択培地の組成を決定した。培地を作製し、*A. israelii* を含む代表的な口腔細菌の回収率を調査した。培養は 37℃、嫌気条件下で 1 週間行った。それから本選択培地を用いて被験者 20 名から集めた歯垢試料中の *A. israelii* の割合を調べた。培地上の集落は、本研究で設計した *A. israelii* 菌種特異的プライマーを用いた PCR 法により菌種同定を行った。【結果と考察】 *A. israelii* は選択培地上で良好な発育を示し、それ以外の代表的な口腔細菌の発育は、著しく阻害された。すべての被験者の歯垢試料において *A. israelii* は検出され、BHI 培地を用いて算定した総菌数に対する *A. israelii* の割合は 0.46%であった。これらの結果から、本選択培地は *A. israelii* の分離に有用であり、本菌がヒト口腔の常在細菌であることが推察された。【利益相反】 利益相反状態にはありません。

A novel selective medium for the isolation and distribution of *Actinomyces israelii*

○Tsuzukibashi O¹, Uchibori S², Saito M¹, Kobayashi R¹, Takizawa T¹,
Shinozaki-Kuwahara N¹, Ochiai T¹

¹Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

²Dept Crown Bridge Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Purpose: *Actinomyces israelii* is known as the key species responsible for actinomycosis, but it is often isolated in connection with other oral infections, such as peri-implantitis. Although *A. israelii* are frequently isolated from human oral cavities, the distribution of this microorganism has been little reported. The aim of this study was to develop a selective medium for *A. israelii* and to examine the bacterium population in the oral cavities. **Materials & Methods:** To develop the selective medium, following the selections of the base medium and antibiotics, the growth recoveries of representative oral bacteria including *A. israelii* were examined. The proportion of *A. israelii* in dental plaque samples collected from 20 subjects was examined. The colonies on the selective medium were identified by PCR analysis using the primers designed in this study. **Results & Conclusion:** The growth of other representative oral bacteria except for *A. israelii* was remarkably inhibited on the selective medium. *A. israelii* was detected in dental plaque samples of all subjects, and the ration of *A. israelii* CFU to the total CFU on BHI medium was 0.46%. These results indicated that the selective medium was useful for the isolation of *A. israelii* and this microorganism was a part of oral flora.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-131 ヒト歯肉溝から分離された赤色集落を呈する新菌種 *Propionibacterium gingivaerubrum* の解析

○齋藤 真規, 桑原 紀子, 續橋 治, 瀧澤 智美, 小林 良喜, 落合 智子

日大松戸歯 微生物免疫

歯周病原細菌の分離を行っていた際にヒト歯肉溝から得られた赤色でラフ型集落を呈する菌種 (SK-1^T) について報告する. SK-1^Tは Gram 陽性芽胞非形成非運動性多形性桿菌であり, ブドウ糖存在下における最終代謝産物として酢酸, プロピオン酸およびコハク酸を産生した. 16S rRNA 遺伝子および RNA ポリメラーゼβサブユニット (*rpoB*) 遺伝子相同性の比較においても近縁だったのは *Propionibacterium propionicum* であり, その相同性はそれぞれ 96.6%および 93.1% だった. 16S rRNA および *rpoB* 遺伝子を基に作成した系統樹において SK-1^Tは *Propionibacterium* 属菌のクラスターに分類され, *P. propionicum* にもっとも近縁と判断された. また, *P. propionicum* との DNA-DNA ハイブリダイゼーション結果, 相同性は 50%未満であり, 新菌種であると推察された. DNA 中の GC 含量は 61.8%であり, *Propionibacterium* 属菌 (53-67%) と類似していた. これらの結果から SK-1^Tは *Propionibacterium* 属菌の新菌種であり, *Propionibacterium gingivaerubrum* と命名した. さらに SK-1^Tの歯周病原細菌に対する効果を検討したところ, 歯周病原細菌の増殖を抑制したことから歯周病予防効果があるものと推察された. 本研究は JSPS 科研費 25870786 の助成を一部受けたものです.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Propionibacterium gingivaerubrum sp. nov., a red-pigmented species isolated from human gingival sulcus

○Saito M, Kuwahara N, Tsuzukibashi O, Takizawa T, Kobayashi R, Ochiai T

Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

A Gram-stain-positive, pleomorphic, rod-shaped, non-spore forming and non-motile organism, designated SK-1^T, was isolated from human gingival sulcus. Strain SK-1^T produced acetic acid, propionic acid, lactic acid, and succinic acid from glucose. Comparative 16S rRNA gene-sequencing analysis suggested classification of the organism in the genus *Propionibacterium*. Strain SK-1^T was related most closely to *Propionibacterium propionicum* with 96.6% and 93.1% similarity based on the 16S rRNA gene and the RNA polymerase β subunit encoding gene (*rpoB*), respectively. DNA-DNA hybridization analysis showed that the novel strain displayed less than 50% DNA-DNA relatedness with the type strain of *P. propionicum*. The G + C content of the genomic DNA of the isolate was 61.8 mol%. On the basis of 16S rRNA gene and housekeeping gene sequence data, we propose a novel taxon, *Propionibacterium gingivaerubrum* sp. nov. Furthermore, to investigate the potential role of strain SK-1^T in preventing periodontal disease, the antibacterial activity of strain SK-1^T on periodontopathogens was examined. Strain SK-1^T showed inhibitory effect on growth of periodontopathogens. This study suggested that strain SK-1^T is effective in preventing periodontal disease. This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number 25870786.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-132 口腔由来 *Rothia* 属細菌における硝酸還元性についての検討

○真下 千穂, 円山 由郷, 山中 武志, 山根 一芳, 王 宝禮, 南部 隆之
大歯大 細菌

【背景】唾液中の硝酸イオンが還元され、最終的に生成した一酸化窒素(NO)が口腔の殺菌効果に
関与していることが知られている。近年の口腔メタゲノム解析研究により、口腔内で高い硝酸還
元活性をもつ細菌として、*Veillonella*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Staphylococcus* などの菌種が見つかっ
てきた。さらに、*Rothia* 属細菌は、歯周組織健常者の口腔常在細菌叢のコアメンバーであることが
明らかになってきた。我々は、この現象の原因のひとつが、口腔アクチノバクテリアがもつ高い
硝酸還元活性であると考え、*Porphyromonas gingivalis* に対する殺菌効果を明らかにしてきた。本
研究では口腔より分離した *Rothia mucilaginosa* を対象に硝酸還元活性の差異を検討した。【方法】
R. mucilaginosa 選択培地 (RMSM) および特異的プライマーを用いた PCR 法で舌背より分離した
株および ATCC25296 株を対象とした。硝酸還元活性は以下の2つの方法により測定した。1. 固
型培地に発育したコロニー上に、Griess 試薬を含む寒天培地を重層し、硝酸還元活性を呈色反応
により視覚化した。2. 静置で一晩培養した菌液に、嫌気条件下で硝酸ナトリウムを添加し、消費
された NO₃-と生成した NO₂-の経時的な変動を計測した。【結果と考察】口腔より分離した *R.*
mucilaginosa の硝酸還元活性には株間による差異が認められた。現在、対象にした菌株のゲノム
解析を進行しており、硝酸還元活性に関する遺伝学的背景を明らかにしていく予定である。本
研究は口腔アクチノバクテリアが口腔健康に寄与するメカニズムを明らかにするための一端を
担うと考える。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Variations of nitrate-reducing activity in *Rothia* spp.

○Mashimo C, Maruyama Y, Yamanaka T, Yamane K, Oh H, Nambu T
Dept Bacteriol, Osaka Dent Univ

It is well-known that nitric oxide resulting from the reduction of salivary nitrate plays a beneficial
antimicrobial role in the oral cavity. Recent genomic analysis of nitrate reductase-positive bacteria in the
oral cavity revealed that certain bacterial species (members of *Veillonella*, *Actinomyces*, *Rothia*,
Staphylococcus, etc.) have the capacity to reduce nitrate. Recent metagenomics studies have shown a
strong correlation between the presence of oral Actinobacteria (*Rothia* spp. and *Actinomyces* spp.) within
oral subgingival bacterial communities and the periodontal health. We hypothesize that this correlation is
partially resulted from the microbicidal efficacy of nitrate-reducing system in Actinobacteria and
demonstrated that *Actinomyces oris* kills *Porphyromonas gingivalis* in a nitrate-dependent manner. In this
study, we isolated three *Rothia* spp. from dorsal surface of the tongue and tested Griess reaction assay and a
NO_x analyzer on them. We interestingly found that they exhibited different nitrate-reducing activity. It is
now on-going to investigate whether this different activity is caused by gene expression levels or genes
themselves.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-133 糖代謝の生化学的性質からみる *Bifidobacterium* の齲蝕関連性

○安彦 友希^{1,2}, 菅原 敦信³, 村上 和弘³, 川嶋 順子⁴, 高橋 信博¹

¹東北大 院歯 口腔生化

²東北大 院歯 歯学イノベーションリエゾンセ

³東北大 歯 6年

⁴東北大 東北メディカルメガバンク機構

【目的】 *Bifidobacterium* は腸内細菌として知られているが、近年、ヒト口腔、主に齲蝕病変からも高頻度で検出されることが明らかになってきた。そこで本研究では、口腔を模した環境における *Bifidobacterium* の糖代謝活性及び最終代謝産物について分析し、その齲蝕関連性について検討した。また *Bifidobacterium* は外来性糖がなくとも酸を産生することが報告されていることから、菌体内多糖についても分析した。

【方法】 *B. longum* JCM1217, 対照として *Streptococcus mutans* NCTC10449 を用い、実験は全て嫌気条件下で行った。pH-stat により pH 7.0 及び 5.5 でのグルコースからの酸産生活性を 2 時間測定した。得られた最終代謝産物は高速液体クロマトグラフィーにて定量した。菌体内多糖は通法により単離し、ヨウ素呈色による吸収スペクトラムを用いて解析した。

【結果】 グルコース添加後 10 分間の酸産生活性は、*S. mutans* が *B. longum* よりも pH 7.0 で 2.2 倍、pH 5.5 で 1.7 倍高かった ($p < 0.001$)。 *S. mutans* の pH 7.0 の酸産生活性は pH 5.5 よりも 1.1 倍高かった ($p < 0.05$) のに対し、 *B. longum* では pH 5.5 の方が 1.2 倍高かった ($p < 0.05$)。さらに *B. longum* は 2 時間後も酸産生活性を保ち、グルコース非添加でも酸産生活性が見られた。グルコース非添加時の酸産生活性は pH 7.0 よりも pH 5.5 の方が 1.3 倍高かった ($p < 0.05$)。 *B. longum* の主要な最終代謝産物は酢酸で、pH 5.5 では乳酸の割合が増加した。また *B. longum* は菌体内多糖を持ち、その構造はグリコーゲンと類似していると推察された。

【考察】 *B. longum* は、 *S. mutans* よりも酸産生活性が低かったものの、酸性環境での酸産生活性が相対的に高く、また大量のグリコーゲン様菌体内多糖を蓄積できることから、齲蝕病巣のような外部からの糖供給が少ない酸性環境で酸を産生し続けることが考えられた。これらのことから *Bifidobacterium* は齲蝕病巣環境を維持・悪化させる可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The cariogenic potential of oral *Bifidobacterium* in terms of carbohydrate metabolism

○Abiko Y^{1,2}, Sugahara A³, Murakami K³, Kawashima J⁴, Takahashi N¹

¹Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent

²Liaison Center Innovative Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

³6th grade, Tohoku Univ Sch Dent

⁴TooMo, Tohoku Univ

Objective: *Bifidobacterium* have recently been detected in carious lesions. Thus, the purpose was to examine the cariogenic potential of oral *Bifidobacterium* by analyzing the carbohydrate metabolism and acidic end-products. In addition, intracellular polysaccharide was characterized.

Materials and Methods: *B. longum* JCM1217 and the *Streptococcus mutans* NCTC10449 as a control were used. The acid production from glucose was measured at pH 7.0 and 5.5 under anaerobic conditions for 2 hours with pH-stat. The acidic end-products were analyzed by HPLC. Intracellular polysaccharides were characterized by absorption spectrum using iodine reaction.

Results: The acid production of *B. longum* was 1.7–2.2 times lower than that of *S. mutans*, and maintained even after 2 hours. Without glucose addition, the acid production was also found. Both with and without glucose, the acid production was higher at pH 5.5 than that at pH 7.0. The main acidic end-product was acetate. Absorption spectrum indicated that the intracellular polysaccharide was glycogen-like.

Discussion: *B. longum* showed a higher acid production at pH 5.5 than 7.0, and had a considerable amount of glycogen-like intracellular polysaccharides, suggesting that oral *Bifidobacterium* can maintain and promote the environment of carious lesions, i.e. sugar limit and acidic.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-134 蛍光色素を用いた口腔プラークバイオフィーム代謝活性の高感度測定法

○鷺尾 純平, 石黒 和子, 入江 大貴, 内山 愛理, 高橋 信博

東北大 院歯 口腔生化

【背景】口腔プラークバイオフィーム (PB) の病原性は, その代謝活性と緊密に関係している. しかし, 試料として使用できる PB の量が少ないことから, 糖代謝由来の酸産生量をモニターする pH-stat 等の既存手法で糖代謝活性を測定することは難しく, また, 糖以外の代謝活性については測定そのものが難しかった. 近年, 我々は蛍光色素 alamarBlue を用い, 少量の細菌を対象とした代謝活性測定を確立し報告した. そこで本手法を応用し, 少量の PB を対象とした様々な基質に由来する代謝活性の測定を試みた.

【方法】インフォームドコンセントを得た 3 人の被験者より, PB を 5 部位 (上顎前歯, 下顎前歯, 上顎臼歯, 下顎臼歯, 舌背) に分け採取した. 採取は別日に 3 回行った. これらの試料に, 代謝基質 (0.5% glucose, 0.5% tryptone, 10 mM cysteine もしくは 10 mM arginine) 及び 1% alamarBlue を加え, 37°C で蛍光強度を蛍光分光プレートリーダーにて連続的に測定した. さらに, それぞれの部位より採取した試料に含まれる細菌数を細菌カウンター (Panasonic 製) にて計測した.

【結果と考察】代謝基質非添加でも, PB 内在性基質の代謝に由来する蛍光強度の緩やかな増加が観察されたが, 代謝基質を添加すると蛍光強度が急増したことから, 本法によって様々な基質に由来する PB 代謝活性を測定できることが示された. 本法では, 0.05-0.1 mg といった極少量の PB でも代謝活性測定が可能であった. さらに, 測定された代謝活性は, 単位細菌数当たりで採取部位間, 個人間, 採取日間により, 最大で 3.9 倍から 10.3 倍異なっており, PB の代謝活性はこれらの変動を考慮した上で評価する必要があることが示唆された.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

A high sensitive fluorescence-mediated assessment of the metabolic activity of oral plaque biofilm

○Washio J, Ishiguro K, Irie D, Uchiyama A, Takahashi N

Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Objective: The pathogenicity of plaque biofilm (PB) is related to its metabolic activity (MA). However, the MA measurement was difficult because of the small amount of PB. Recently, we established a new method using fluorescence dye alamarBlue to monitor bacterial MA, and then attempted to apply this method to PB.

Methods: Informed consent was obtained from 3 volunteers. PB on various oral surfaces (upper front teeth, upper molars, lower front teeth, lower molars, and tongue) were collected 3 times on different days. The samples were mixed with 1% alamarBlue and then mixed with a metabolic substrate (0.5% glucose, 0.5% tryptone, 10 mM cysteine or 10 mM arginine). The fluorescence intensity (FI) was monitored at 37°C. The bacterial number in each sample was determined with bacterial counter.

Results and Discussion: The addition of metabolic substrates increased FI in PB reaction mixture. A tiny amount of PB (0.05-0.1 mg) was enough for this method. These results indicate that this method can be used to evaluate the MA of a tiny amount of PB. Furthermore, the MA was various among oral surfaces, individuals, and sampling days, suggesting that these variations should be considered for the evaluation of MA-related pathogenicity.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-135 歯の着色に影響を及ぼす歯周病原細菌について

○今井あかね^{1,3}, 松田 貴絵²

¹日歯大新潟短大 歯科衛生

²日歯大新潟 小児歯

³日歯大新潟 生化

【目的】近年、歯の審美性において白い歯のニーズが高まっている。歯の外因性着色には飲食物、唾液成分、pH、口腔内細菌によるものなどいろいろな要因が複雑に絡んでいる。歯周病原細菌と歯の着色については *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.)による black stain が有名だがその他の報告は少ない。そこで我々は歯の色と歯周病原細菌との関連性について調べることを目的にした。

【方法】日本歯科大学新潟短期大学1年生および専攻生54名を研究対象として、シェードガイド(クラレノリタケデンタル社)を用いて歯冠色の調査を行った。また、上顎左側臼歯部の頬側表面よりプラークを採取し、そこに含まれる細菌DNAを調製して歯周病原細菌5種類 [*A.a.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*] の特異的プライマーを用いてPCR反応を行い、増幅産物のサイズにより歯の同定を行った。

【結果と考察】シェードによる歯の着色度合いにより白色群(30名)と着色群(24名)に分けた。プラーク中に5種類うち何種の歯が存在しているか調べたところ、白色群で 1.23 ± 0.15 (平均 \pm SE)、着色群で 2.04 ± 0.21 種類を検出した。有意に着色群の保菌種類数が多かった ($p < 0.01$)。この結果より歯周病原細菌と歯の着色に関連性あると考えられた。

【結論】着色歯を持つものは複数種類の歯周病原細菌を保菌している可能性が高い。

本研究は諏方菜都希、菊地ひとみ助教(日本歯科大学新潟短期大学)との共同研究によるものである。また、JSPS 科研費(15K2061, 15K11063)の助成金を受けた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effect of periodontopathic bacteria on teeth discoloration

○Imai A^{1,3}, Matsuda K²

¹Dept Dent Hygiene, Nippon Dent Univ Coll at Niigata

²Dept Pediatr Dent, Nippon Dent Univ at Niigata

³Dept Biochem, Nippon Dent Univ at Niigata

Purpose: Recent dental esthetics are paying attention to whitening. Many factors cause to teeth discoloration. Although one of them is suggested by prevalence of periodontopathic bacteria, little has been clearly reported. The aim of the present study was to clarify relationship between periodontopathic bacteria presented in the plaque and teeth discoloration.

Methods: Dental plaque samples were collected from 54 young women, and their teeth color was evaluated using shade guides. Using the DNA of the bacteria prepared from the plaque samples, PCR was performed with specific primers to identify 5 periodontopathic bacteria [*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*] based on the size of amplified products. The numbers of bacterial species per person were calculated for each color group by shade level.

Results & Discussion: Subjects were divided into a white group (30 women) and a discolored group (24 women). Capitulated means \pm SE of the bacterial species were 1.23 ± 0.15 and 2.04 ± 0.21 in white and discolored groups, respectively. It showed certainly significant difference between white and discolored groups ($p < 0.01$). It was suggested that teeth color was related to the number of periodontopathic bacterial species.

Supported by JSPS KAKENHI (15K2061, 15K11063).

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-136 歯周病をひきおこす病原微生物の菌体成分の同定

○成田 由香, 永尾 潤一, 田崎 園子, 有田 (森岡) 健一, 橋本麻利江, 池崎晶二郎,
長 環, 田中 芳彦

福歯大 機能生物 感染生物

歯周病は口腔細菌により引き起こされる慢性感染症であり、歯周病の発症と進行には免疫応答が関与する。ヘルパー T 細胞を欠損したマウスでは歯周病感染に抵抗性であり、その病態に T 細胞による免疫応答が関与する。歯周病患者の口腔内にはヘルパー T 細胞が多く存在することが知られており、歯周病原細菌そのものがヘルパー T 細胞を分化する抗原であることが示唆されている。これまでに歯周病原細菌のコンポーネントを単発的に用いてヘルパー T 細胞の分化への影響を検討した報告はあるものの、歯周病原細菌の抗原性に着目して包括的に解析した研究は見当たらない。そこで、重度歯周炎に関連する Red Complex に属する歯周病原細菌でありゲノムシーケンスが決定されている、*Porphyromonas gingivalis* W83 株ならびに *Tannerella forsythia* ATCC43037 株を対象とし、サイトカインの産生を指標としてヘルパー T 細胞の分化への影響を包括的な解析を行った。骨髓由来樹状細胞を抗原提示細胞とし、抗原として分画した各種菌体成分を用いて、野生型マウスから単離したナイーブ T 細胞を *in vitro* でヘルパー T 細胞の分化誘導を行い、主要な抗原部位を有する菌体成分の探索を行った。さらに、逆相 HPLC による分画成分を用いて、ヘルパー T 細胞を分化誘導する歯周病原細菌成分の候補を見出したので報告する。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Identification of periodontal pathogen's components inducing T cell response

○Narita Y, Nagao J, Tasaki S, Arita-Morioka K, Hashimoto M, Ikezaki S, Cho T,
Tanaka Y

Div Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll

Periodontal diseases are chronic infections caused by oral pathogenic bacteria, and immune response contributes to their onset and progression. CD4⁺ T cells knockout mice are resistant to periodontal infections, and immune response of T cells contribute to its clinical condition. It is known that CD4⁺ T helper cells exist in the oral cavity of periodontal disease patients, and periodontal pathogens themselves are considered as antigens in CD4⁺ T helper cell differentiation. However, there is a little known about periodontal pathogen's components inducing immune response of T helper cells. Therefore, we conducted a comprehensive analysis how Red complex bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis* W83 and *Tannerella forsythia* ATCC43037, associated with severe periodontitis affected T helper cell differentiation. We divided Red complex bacteria into several components to explore periodontal pathogen's epitopes in T helper cell differentiation. Indeed, we used bone marrow-derived dendritic cells as an antigen presenting cell while using fractionated bacterial components as antigens, and stimulated naive T cells isolated from wild-type mice to differentiate into T helper cell subsets *in vitro*. We identified periodontal pathogen's candidates for inducing immune response of T helper cells. We hope to discuss about the induction of T cell response for periodontal diseases.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-137 殺菌性を有する食品を利用した歯周病原細菌の制御に関する研究

○中尾 龍馬, 泉福 英信

感染研 細菌 1

【目的】安全で殺菌効果を示す食品を用いた歯周病予防・治療法の開発を視野に, 本研究では, カレーリーフ (Cu), ジンジャー (Gi), クローブ (Cl) の3種類の食品による歯周病原細菌の生育阻害, および殺菌様式について検討を行った. 【方法】Cu, Gi, Cl からそれぞれエタノール抽出物を得て各種実験に供試した. 対象菌種として歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis*, および8種の口腔レンサ球菌を使用した. 各食品エタノール抽出物の菌に対する増殖抑制効果や殺菌性を調べるとともに, 菌体の形態に及ぼす影響を, 走査型電子顕微鏡や原子間力顕微鏡動画システムにて観察した. 【結果】Cu, Gi, Cl の *P. gingivalis* に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は, それぞれ 32, 16, 64 $\mu\text{g/ml}$ であった. これら3種の食品はいずれも *P. gingivalis* に対して殺菌的に作用し, 特に Cu, Cl については迅速な殺菌 (30分以内) が可能であった. また上3種中2種のコンビネーションを *P. gingivalis* に添加した場合, すべての組み合わせで相加効果が認められたが, 相乗効果は認められなかった. また100°C, 20分の熱処理により, Cu と Gi の殺菌活性は維持されたが, Cl の活性は低下した. *P. gingivalis* の形態観察において, Cu と Gi は菌体表層での過剰な小胞形成, Cl は表面の粗造化から溶菌に至り, 最終的に殺菌される過程が明らかとなった. 一方で, Cu, Gi の口腔レンサ球菌8種に対するMICは, *P. gingivalis* に比べ高値であった. 【考察】本実験に供試した食品が, 将来の歯周病予防・治療薬として応用できる可能性が示唆された.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Research in candidate foods with bactericidal activity against periodontopathic bacteria

○Nakao R, Senpuku H

Dept Bacteriol I, Natl Inst Infect Dis

In the context of candidate foods with both bactericidal activity and safety in novel therapy for periodontal diseases, we investigated the bactericidal effects of 3 different foods: curry leaf (Cu), ginger (Gi), and clove (Cl). Crude extracts from these foods were prepared by ethanol extraction and used for a series of microbiological assays. All of them showed the bactericidal effect on *Porphyromonas gingivalis*, and the MICs of Cu, Gi, and Cl were determined to be 32, 16, and 64 $\mu\text{g/ml}$, respectively. No synergistic effect was observed in the combination of any 2 of 3 foods. Heat treatment at 100 °C for 20 minutes decreased the bactericidal activity in Cl, but not in Cu and Gi. Morphological analysis using a real-time atomic force microscopy as well as scanning electron microscopy revealed that Cu and Gi immediately triggers aberrant vesiculation on the bacterial surface of *P. gingivalis*, while Cl makes the surface rough and eventually induces rupture of the whole cells. MICs of Cu and Gi against 8 different species of *Streptococci* are higher as compared to *P. gingivalis*. We suggest a possible prophylaxis and/or therapeutic application using 3 foods used in the present study to periodontal diseases.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-138 金属イオンによる消臭メカニズムの解明

○谷口 奈央¹, 中野 善夫², 桑田 文幸², 埴岡 隆¹

¹福歯大 口腔保健

²日大 歯 化学

【目的】銀や亜鉛などの消臭メカニズムとして、金属イオンによる抗菌作用と金属イオンと臭気成分の結合とが考えられている。これまでに、揮発性硫黄化合物 (VSC) に対する金属イオンの作用は細菌培養液を用いて検討されており、抗菌作用と結合の区別が明確でなかった。そこで本研究では銀や亜鉛に加え、消臭効果が不明なものも含めた 10 種類の金属イオンについて、硫化水素発生に対する直接的な抑制作用を調べた。また細菌の生育抑制作用についても検討した。【方法】9 種類 (Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, Cd) の金属塩化物および 6 種類 (Ca, Fe, Cu, Zn, Ag, Cd) の金属酢酸塩の 1 mol/L 溶液あるいは飽和溶液と 0.001% NaHS · nH₂O 水溶液とを 1 : 1 で混合し、5 分経過後、ガスクロマトグラフィーを用いて反応液気相部の硫化水素濃度を測定した。硫化水素発生に対して抑制作用を示した金属イオンについては水溶液を段階希釈し、最小有効濃度を調べた。口腔内細菌に対する生育抑制作用については、洗口液に配合されている塩化亜鉛を用いて調べた。【結果と考察】銅、亜鉛、銀、カドミウムは硫化水素発生を完全に抑制し、抑制の強さは銀>カドミウム>銅>亜鉛であった。塩化亜鉛による口腔内細菌の生育抑制作用は、齲蝕原因菌である *Streptococcus mutans* よりも VSC 産生菌である *Porphyromonas gingivalis* に対して強かった。これらの金属イオンは、VSC 産生菌に対する抗菌作用ならびに臭気成分との直接結合の 2 つのメカニズムにより、口臭をコントロールすることがわかった (会員外共同研究者 福歯大歯学部 4 年 麻生政樹, 坂田凜太郎, 福歯大口腔保健学講座 渡辺 猛)。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Inhibitory mechanism of odor by metal ions

○Taniguchi N¹, Nakano Y², Kuwata F², Hanioka T¹

¹Dept Prev Public Health Dent, Fukuoka Dent Coll

²Dept Chem, Nihon Univ Sch Dent

It is considered that metal ions, such as Ag and Zn, inhibit odor by binding to sulfide ion in addition to by its antimicrobial effect. The aim of this study was to examine two mechanisms separately. First, the sulfide ion-binding activities of total 10 metal ions (Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, Ag, Cd) were evaluated. The ions of Cu, Zn, Ag and Cd inhibited the generation of hydrogen sulfide by entirely binding to sulfide ions. Their inhibitory activities were Ag>Cd>Cu>Zn in order of strength. Next, the inhibitory effect of zinc ion against the growth of oral bacteria was evaluated. Zinc ion inhibited greater *Porphyromonas gingivalis*, which is a VSC-producing organism, compared to *Streptococcus mutans*, which is a cariogenic organism. It was revealed that these metal ions have two mechanisms for controlling oral malodor, i.e., the antimicrobial effect on VSC-producing bacteria and the binding to sulfide ion.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-139 フランス海岸松樹皮抽出物の歯垢形成抑制効果

○渡辺 清子¹, 平嶺 浩子², 遠山 歳三¹, 佐々木 悠¹, 浜田 信城¹

¹神歯大 院歯 口腔科学

²神歯大 院歯 高度先進口腔医学

【目的】ピクノジェノール (PYC) は、フランス海岸松の樹皮から抽出される抗酸化作用および抗炎症作用を有する植物性生理活性物質である。本研究では、7菌種の口腔細菌に対するPYCの抗菌活性およびバイオフィーム形成抑制効果について検討するとともに、PYC含有チューイングガムの日常的な摂取による歯垢形成抑制効果について検討した。【材料および方法】抗菌効果の測定は、種々の濃度のPYC液に 1×10^7 CFUの口腔内細菌を添加し10分間作用させた後、BHI血液寒天培地に塗抹し生菌数を算定して求めた。バイオフィームは24 well plateあるいはカバーグラス上で作製し、種々の濃度のPYCを添加することによる抑制効果について検討した。PYC含有ガム摂取による歯垢形成抑制効果は、無作為に分けた被験者に対し、実験群では1回当たり5mgのPYC含有ガムを1日6回、1回につき15分間、対照群にはPYC非含有プラセボガムを同様に噛むよう指示し、実験開始時、2週間後、4週間後の歯垢形成量の変化について測定した。【結果および考察】*Actinomyces viscosus* ATCC 15987株を除く被験菌に対して、PYC 1 mg/ml 処理により明らかな生菌数の減少が認められた。特にグラム陰性桿菌に対しての活性は高く、濃度依存的に*P. gingivalis* ATCC 33277株および*A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523株のバイオフィーム形成を抑制した。また、PYC含有ガム摂取群の歯垢蓄積量はガム摂取4週間後に有意に減少し、さらにプロービング時の出血の改善が認められた。以上の結果から、フランス海岸松樹皮抽出物は種々の細菌に対して抗菌活性を有しバイオフィーム形成を抑制することにより、歯垢形成の抑制に働くことが示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Inhibitory effects of French pine bark extract on dental plaque formation

○Watanabe K¹, Hiramane H², Toyama T¹, Sasaki H¹, Hamada N¹

¹Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

²Dept Highly Adv Stomatol, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

Purpose: The aim of this study was to evaluate the effect of chewing gum containing Pycnogenol, a phytochemical extract of French pine bark, on plaque formation. **Materials and Methods:** Antibacterial activity against oral bacteria was determined by relative viability after the treatment with the extract. Inhibitory effect on biofilm formation of *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans* on the cover glass was also evaluated. Subjects were randomly divided into an experimental group and a placebo group and instructed to chew two pieces of Pycnogenol or placebo gum six times daily for 15 min during the intake period. Individual clinical periodontal status was examined at weeks 0, 2 and 4. **Results and Conclusion:** The extract possessed marked antibacterial activity against oral bacteria, including cariogenic and periodontopathic bacteria. An apparent inhibitory effect on biofilm formation of *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans* was observed in a dose-dependent manner. The Pycnogenol gum group showed significantly reduced plaque accumulation compared to the baseline at four weeks. Pycnogenol group also showed significant improvement of bleeding on probing at two weeks. These results suggest that the extract is effective to reduce plaque formation by its antibacterial activity and to promote periodontal health.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-140 テルペン化合物のバイオフィーム浸透性における構造活性相関の検討

○藤田 真理¹, 長田 和実², 宮川 博史¹, 中澤 太¹

¹北医療大 歯 微生物

²北医療大 歯 生理

【目的】近年、我々は環境分析などに応用されるヘッドスペース固相マイクロ抽出法 (HS-SPME) を用いて既成バイオフィーム中に浸透したテルペンを抽出、定量する方法を確立し、植物精油由来 terpinen-4-ol (モノテルペンアルコール) の *Streptococcus mutans* の既成バイオフィームに対する顕著な浸透性を確認した。本研究では terpinen-4-ol の既成バイオフィームに対する浸透機構と構造の関係を明らかにするため、terpinen-4-ol のヒドロキシ基がアセチル基に置換された terpinyl acetate-4 を用い、浸透性の違いについて比較検討を行った。【方法】1%スクロース含有 Tryptic soy broth で培養した *Streptococcus mutans* Ingbritt 株の既成バイオフィームを各テルペンで処理後、PBS で洗浄し、バイオフィーム内に残留したテルペン量を HS-SPME 法を用いて抽出し、四重極ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で分析した。また、処理後の既成バイオフィームは PBS 中に再懸濁して TY 寒天培地上に播種し、培養後、コロニー数を計測して生菌数を算出した。【結果と考察】HS-SPME を用いた定量法により、Terpinyl-acetate-4 が Terpinen-4-ol と同様に処理時間依存的に既成バイオフィームに浸透することが確認された。これらの結果より、terpinen-4-ol のバイオフィームに対する顕著な浸透性はヒドロキシ基に依存するものではないことが示唆されたが、構造活性相関の評価は、テルペン化合物の既成バイオフィームに対する浸透機構を解明するために有益なアプローチであるといえる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Evaluation of structure-activity relationships in penetration of terpene compound into the preformed biofilm

○Fujita M¹, Osada K², Miyakawa H¹, Nakazawa F¹

¹Div Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

²Div Physiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

We had previously reported that terpinen-4-ol (monoterpene alcohol) derived from plant essential oil had the superior antibacterial effect on bacterial cells in the preformed biofilm, and established new quantitative measurement method of terpenoids in the preformed biofilm by headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME). In this study, we used terpinyl acetate-4 to compare with terpinen-4-ol to examine structure-activity relationships in penetration of terpene compound into the preformed biofilm. After treatment and wash with PBS, the amount of terpene compound remaining in the preformed biofilm of *Streptococcus mutans* Ingbritt were quantified by using HS-SPME combined with gas chromatography-quadrupole mass spectrometer. In addition, the total viable counts of bacteria in the preformed biofilm were examined. Terpinyl acetate-4 was detected from preformed biofilm in a time-dependent manner as well as terpinen-4-ol. These results demonstrated that the remarkable penetration activity of terpinen-4-ol against biofilm was not provided by its OH group. However, the evaluation of structure-activity relationships is beneficial approach to clarify the penetration mechanism of terpene compound into preformed biofilm in the future.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-141 アリルイソチオシアネートが *Candida albicans* に及ぼす影響

○田村 宗明^{1,2}, 落合 邦康¹, 今井 健一^{1,2}

¹日大 歯 細菌

²日大 総歯研 生体防御

【目的】 日常的な口腔ケアの欠如は常在微生物の増加と遷移を誘導しさまざまな全身疾患発症に関わっている。したがって、口腔環境の維持改善が重要な問題となる。*Candida albicans* は義歯装着率の高い高齢者口腔から検出率が高い二形性の真菌で、口腔カンジダ症のみならず、日和見感染症や誤嚥性肺炎そして重篤な内臓真菌症の原因菌である。この真菌の宿主に対する主な病原因子として付着能、菌糸形変換およびタンパク分解酵素産生能が報告されている。今回、ワサビから抽出した成分のアリルイソチオシアネート (AITC) を供試し、*C. albicans* の発育能、付着能、菌糸形変換能およびタンパク分解酵素産生能に及ぼす抑制効果を検討するとともに、臨床応用への可能性について検討した。【方法】 被験菌として *C. albicans* ATCC18804 株と NUD202 株を供試した。被験菌を AITC 添加培地で培養後、比濁法と改良型寒天拡散法に評価し、発育に及ぼす影響を検討した。付着能への影響では、AITC のジェルと義歯床用レジンを用いて実験を行い、付着菌数を培養法にて算定した。菌糸形変換能への影響は、被験菌を AITC および血清添加培地で培養後に flow cytometry 分析にて菌形の変化を観察した。さらに、タンパク分解酵素産生能への影響については、AITC 添加培地で培養した上清中の分泌型アスパラギン酸プロテアーゼ (SAP) 活性を比色定量法にて測定した。【結果と考察】 AITC は濃度依存的に供試した 2 菌株の発育を抑制した。さらにレジンへの付着を顕著に阻害し、菌糸形変換の抑制も確認された。さらに、AITC の添加により SAP 活性は顕著に減少した。これらの結果から、AITC は抗真菌薬として口腔ケアに有用であると考えられる。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Inhibitory effect of allyl isothiocyanate against *Candida albicans*

○Tamura M^{1,2}, Ochiai K¹, Imai K^{1,2}

¹Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent

²Div Immunol Pathobiol Res Cent, Nihon Univ Sch Dent

Candida albicans is the most frequently isolated fungus from humans. It is well known that this fungus is an opportunistic pathogen and, likewise, cause candidiasis during an immunologically deficient state or a microbial substitution attributable to long-term administration of an antibacterial agent. In the oral cavity, *C. albicans* sometimes set up an acute pseudomembranous candidiasis and thrush. Moreover, denture stomatitis also occurs among denture wearers ascribable to this microorganism. Here, we examined the antifungal action of allyl isothiocyanate (AITC) against *C. albicans* growth and pathogenic factors. *C. albicans* ATCC18804 and NUD-202 were employed. AITC effect on *C. albicans* growth was measured by turbidity. Resin piece containing *C. albicans* was incubated with AITC and antifungal activity was measured by CFU. The effect on the hyphal formation with AITC was observed by Flow Cytometry. *C. albicans* proteinase production activity after incubation with AITC was measured by Colorimeter Analysis. We found that turbidity after incubation with AITC was lower than control. Moreover, AITC obstructed the properties of attachment to resin, hyphal formation, proteinase production such as important pathogenic factors of this fungus. These results suggest that AITC could be useful for controlling *C. albicans* number and pathogenicity in oral cavity.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-142 若年層健常人における口腔内 *Candida* 属真菌の分離状況と薬剤感受性— 第2報—

○福井佳代子¹, 今井あかね^{2,3}, 桑島 治博¹, 仲村健二郎¹

¹日歯大新潟 薬理

²日歯大新潟 生化

³日歯大新潟 短大

【目的】 近年, 免疫不全患者の増加に伴い重篤な真菌症が増えており問題になっている。日和見感染症の原因と言われる *Candida* 属真菌の健常人における研究は十分とは言えない。若年層健常人における口腔内 *Candida* 属真菌の分離状況と薬剤感受性を検索し, 唾液分泌量との関連性を調査した。

【方法】 歯学部学生 77 名を対象とし, 口腔内よりスワブ法にて酵母様 *Candida* 属真菌を採取分離した。分離菌株はゲノム DNA 抽出後, 種特異的プライマーによる multiplex PCR を行い *Candida albicans*, *C.dubliniensis*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*, *C.tropicalis* の 7 種類に同定した。併せて酵母真菌薬剤感受性キット ASTY を用いて抗真菌薬 7 剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を調べた。唾液分泌量を測定し, *Candida* 保菌との関連性を調べた。

【結果】 対象の 13.0% から真菌が分離された。分離同定された菌株は *C.albicans*, *C.dubliniensis*, 未同定株の 3 種類であり, それぞれの割合は 81.8%, 9.1%, 9.1% であった。薬剤感受性では, 同定不明株で itraconazole (ITCZ) に耐性株がみられた。*Candida* 保菌群の平均唾液分泌量は 2.2 ± 1.0 mL で, 保菌無群 3.1 ± 1.9 mL より有意に少なかった。

【考察】 諸外国の臨床分離株ではアゾール系薬剤耐性が増加傾向にあり, 日本でも耐性が出現しはじめている。本実験の若年層健常人分離株から ITCZ 耐性が認められ, 薬剤耐性の蔓延化に注意が必要と考えられる。*Candida* 保菌と唾液分泌量との関連性が認められ, 唾液分泌量が低下すると口腔内細菌叢が変化することや, 唾液中抗菌成分の作用減弱などが要因と考えられる。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Survey on oral carriage of genus *Candida* in young healthy students and the antifungal susceptibility of the isolates - Part 2

○Fukui K¹, Imai A^{2,3}, Kuwashima H¹, Nakamura K¹

¹Dept Pharmacol, Niippon Dent Univ at Niigata

²Dept Biochem, Niippon Dent Univ at Niigata

³Dept Dent Hygiene, Niippon Dent Univ Coll at Niigata

Introduction: Candidiasis is one of the most frequent and serious mycoses in humans. It's important to grasp the carriage of genus *Candida* and the antifungal susceptibility of those. We investigated the prevalence of genus *Candida*, saliva volume and tested the antifungal susceptibility in healthy subjects.

Materials & Methods: Specimens from 77 students were collected by swabbing method, and cultured for 48h in Sabouraud agar plate. The isolates of *Candida* species were identified by multiplex PCR. The antifungal susceptibility was tested using a commercially prepared colorimetric microdilution panel (ASTY). Resting saliva volume was measured with spitting method.

Results: Ten (13.0%) of 77 subjects were positive for oral yeasts. A student had 2 strains. Of isolates, *Candida albicans*, *C.dubliniensis* and unidentified strain occupied 9 (81.8%), 1 (9.1%) and 1 (9.1%), respectively. All the identified strains showed the susceptibility against the tested 7 antifungals. One unidentified strain showed itraconazole-resistance. The saliva volume (2.2 ± 1.0 mL) in *Candida* carriers was significantly smaller than that (3.1 ± 1.9 mL) in non-*Candida* carriers.

Discussion: These suggested that the decrease of salivary secretion might be a risk of oral *Candida* carriage. Because antifungal resistance was observed in healthy students, antifungals should be carefully used to prevent the appearance of the antifungal resistance.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-143 *Candida albicans* 由来 CD4⁺ T 細胞分化誘導画分の解析

○長 環, 田崎 園子, 永尾 潤一, 成田 由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎,
有田 (森岡) 健一, 田中 芳彦

福歯大 機能生物化学

Candida albicans はヒトの皮膚や粘膜に常在する真菌であるが, 超高齢化, AIDS, ガン, 移植など宿主の生体防御能の著しい低下が認められる状況下では, 難治性の表在性あるいは深在性カンジダ症を起こす。表在性カンジダ症における宿主応答の研究は, C タイプレクチン受容体である Dectin などの自然免疫レセプターを介した系の研究がなされてきた。しかし, インターロイキン (IL)-17 産生を特徴とするヘルパー T 細胞 (Th17) 欠損マウスにおける口腔カンジダ症の重篤化が報告 (2009) されて以来, 獲得免疫系でのヘルパー T 細胞の役割が注目されている。我々は, 本菌の粘膜常在とカンジダ症発症のメカニズムを解明するために T 細胞の IL-17 産生応答にフォーカスして解析を試みている。*C. albicans* は環境に依存した酵母形増殖, 菌糸形増殖を示す二形性真菌である。我々の歯垢中では酵母形細胞や短い発芽管を伴った細胞が他の口腔細菌と混在して観察される。病巣では酵母形細胞と長く伸びた菌糸が複雑に絡み合ったバイオフィルムを形成することから, 実験では酵母形細胞および菌糸形細胞を抗原抽出材料とした。タンパク質の分離方法を組み合わせて得た IL-17 産生誘導応答の高い画分についての分子生物学的解析を発表する予定である。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Analysis of *Candida albicans* derived molecules recognized by T cells

○Cho T, Tasaki S, Nagao J, Narita Y, Hashimoto M, Ikezaki S, Arita-Morioka K,
Tanaka Y

Dept Func Biosci, Fukuoka Dent Coll

Candida albicans is a commensal of the oral cavity and the gastrointestinal and genitourinary tracts of humans. The organism is also a common mucosal and systemic pathogen in patients with AIDS, patients who have undergone organ transplantation and immunodeficient patients. *C. albicans* is recognized by various innate receptors, such as the C-type lectin receptors. Th17-deficient and IL-17R-deficient mice experiences severe thrush (2009). Therefore, the Th17 cell response could be a major mechanism of mucosal antifungal host defense. We focus on the mechanism of mucocutaneous immunity to both of *C. albicans* commonly being on the mucosal surfaces and causing disease. We made each yeast and mycelial form-cell lysates by glass bead disruption, and performed HPLC, SDS gel, and tow-dimensional gel electrophoresis. Here we report on the methods of exploration of *C. albicans* derived antigens recognized by T cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-144 樹状細胞とマクロファージ細胞に対する *Candida albicans* の IL-1 β 産生誘導の違い

○長谷部 晃¹, 佐伯 歩¹, 亀崎 良助^{1,2}, 柴田健一郎¹

¹北大 院歯 口腔病態 口腔分子微生物

²北大 院歯 口腔病態 口腔診断内科

C. albicans (Ca) は二形性の常在性の真菌である。IL-1 β はインフラマソームの活性化により成熟型となり分泌される炎症性サイトカインのひとつである。本研究では、Ca がマクロファージ (M ϕ) ならびに樹状細胞 (DC) に IL-1 β 産生を誘導するメカニズムについて調べた。

マウス由来の DC (XS106) ならびに M ϕ (J774.1) を用いた。Ca はウリジン要求性である CAI4 株ならびに正常な増殖性を示す CAI4 に GFP 遺伝子が導入された pACT1-GFP 株を用いた (アバディーン大学・Dr Brown より分与)。XS106 ならびに J774.1 を LPS で 4 時間プライミング後に CAI4 あるいは pACT1-GFP で刺激した。pACT1-GFP は XS106 ならびに J774.1 に IL-1 β 産生を誘導した。一方、CAI4 は XS106 には誘導活性を示したが、J774.1 には活性を示さなかった。そこで、これらの細胞表面の TLR2 ならびに TLR4 の発現を調べたところ、どちらの細胞においても TLR2 ならびに TLR4 を発現していた。これらの細胞に対する IL-1 β 産生誘導は caspase-1 依存的であり、また、両細胞とも細胞死が誘導された。細胞の刺激時の Ca の形態は、pACT1-GFP では酵母型から菌糸型に変化したが、CAI4 では酵母型のままであった。XS106 においては、Ca が酵母型でも菌糸型でも IL-1 β 産生が誘導されたが、J774.1 においては酵母型のままでは IL-1 β 産生が誘導されず、ウリジンにより CAI4 を菌糸型に誘導することで IL-1 β 産生が誘導された。Ca をアムホテリシン B 処理すると、XS106 では Ca の形態に無関係に IL-1 β 産生が誘導されたが、J774.1 では Ca の形態に関係なく IL-1 β 産生が誘導されなかった。また、XS106 ならびに J774.1 における IL-1 β 産生誘導には、Ca が直接細胞に接触していることが重要であった。したがって、DC では Ca の形態・生死に関わらず Ca と接触していれば IL-1 β の産生が誘導されるが、M ϕ では Ca と接触しているだけでなく、Ca が生きていて菌糸型に変化することで IL-1 β の産生が誘導されることがわかった。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Differences in IL-1 β production-inducing activity of *Candida albicans* toward dendritic cells and macrophages

○Hasebe A¹, Saeki A¹, Kamezaki R^{1,2}, Shibata K¹

¹Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

²Dept Oral Diagn Med, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Candida albicans (Ca) is one of fungi which possesses the ability to perform a dimorphic switch from a spherical yeast form to filamentous hyphal cells. IL-1 β is one the proinflammatory cytokines processed via inflammasome activation. In this study, we examined the activity of Ca to induce IL-1 β production by macrophages (M ϕ) and dendritic cells (DC). The cells used were XS106 and J774.1 as DC and M ϕ , respectively. Ca CAI4 and pACT1-GFP were kind gifts from Dr A. J. Brown (Univ Aberdeen, UK). The Ca CAI4 is *ura3*⁻ auxotrophic parental strain for pACT1-GFP. XS106 and J774.1 were primed for 4h with LPS and then stimulated for 16h at 37°C with both strains of Ca. pACT1-GFP induced IL-1 β production by both XS106 and J774.1, whereas CAI4 induced IL-1 β production by XS106, but not by J774.1. The IL-1 β production-inducing activities of pACT1-GFP and CAI4 toward XS106 and J774.1 were caspase-1 dependent and they induced cell death in both XS106 and J774.1. It was found that IL-1 β production by DC in response to Ca was independent of both the form and the viability of the fungus, whereas the production by M ϕ was dependent on transition from yeast to hyphal form.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-145 TRAF6によって制御される基礎的オートファジーは MyD88 の細胞内蓄積により誘導される炎症シグナルの自己活性化を抑制している

○引頭 毅, 堀江 俊, 猪俣 恵, 村上 幸孝

朝日大 歯 口腔感染医療 口腔微生物

MyD88 は Toll 様受容体や TAC1 の下流で細胞内シグナル伝達を始動するアダプター分子であり, 自然免疫や B 細胞の機能調節などにおいて重要な役割を果たしている. MyD88 は細胞に過剰発現させると多量体化して自己活性化する. またヒト MyD88 の L265P 変異は MyD88 の自己活性化を引き起こし, シグナル伝達を惹起してびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の原因となることが知られている. これらのエビデンスより, 定常状態で MyD88 を抑制する機構の存在が想定されるが, 未だ明らかにはされていない. 本研究では MyD88 が基礎的オートファジーによりリソソームで分解されている可能性を報告する. 液胞型プロトンポンプ阻害剤やシステインプロテアーゼ阻害剤でリソソームの機能を抑制したところ, 緩徐ながら TNF などの炎症性サイトカインが誘発されたが, MyD88 を欠損した細胞では応答性が認められなかった. リソソームの機能を阻害すると MyD88 の細胞内蓄積が起きていたことから, MyD88 過剰化が応答の原因であると考えられた. 人工的に一量体化と二量体化を制御可能な MyD88 のフュージョンタンパク質を用いて解析したところ, 一量体の MyD88 は分解されやすく, 二量体化すると分解されにくくなることが分かった. 一量体の状態で免疫沈降を行ったところ, TRAF6 と会合していることが分かった. TRAF6 を欠損した細胞やノックダウンした細胞では, MyD88 の分解が促進され発現が低下していたことから, TRAF6 は MyD88 を二量体化させ安定化させる役割を担っていると考えられた. 以上より, 一量体の MyD88 は基礎的オートファジーによって分解されることで発現レベルが調節されており, これにより MyD88 の自己活性化が防止されていることが示唆された. B 細胞リンパ腫の発生やリソソーム病における炎症の誘発はこのような機能の破綻と関連している可能性があると考えられる.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

TRAF6-regulated basal autophagy prevents autoactivation of proinflammatory signaling initiated through intracellular accumulation of MyD88

○Into T, Horie T, Inomata M, Murakami Y

Dept Oral Microbiol, Div Oral Infect Health Sci, Asahi Univ Sch Dent

MyD88 is an adaptor protein for Toll-like receptors and TAC1, receptors for regulation of innate immunity and B cell responses, respectively. Overexpressed MyD88 is known to autoactivate downstream signaling. Moreover, mutated human MyD88 (L265P) causes diffuse large B-cell lymphoma through its autoactivation. The presence of the mechanism for suppression of MyD88 autoactivation is unknown. Here, we report the possibility that MyD88 is degraded through basal autophagy. Lysosomal inhibition by the inhibitors for vacuolar H⁺ ATPase and cysteine proteases weakly induced proinflammatory cytokines. This response was attenuated in MyD88-deficient cells. Under lysosomal inhibition, MyD88 was accumulated, suggesting that excessive MyD88 causes the response. Analysis using a MyD88 chimeric protein whose monomerization/dimerization can be artificially switched revealed that monomeric MyD88 was susceptible to degradation but dimeric MyD88 stood against degradation. Immunoprecipitation of monomeric MyD88 revealed its interaction with TRAF6. In TRAF6-deficient cells, the level of MyD88 protein was lowered through promoted MyD88 degradation, suggesting its role for stabilization of dimerized MyD88. These findings indicate that the level of MyD88 is regulated by basal autophagic degradation of monomeric MyD88, which prevents MyD88 autoactivation. Development of B-cell lymphoma or inflammation in lysosomal storage diseases may be associated with a failure of such a mechanism.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-146 歯胚血管新生過程における調節因子の同定

○春原 正隆, 関 伸一郎, 佐藤 巖

日歯大 生命歯 解剖 1

【目的】血管新生は胎児の成長発育過程において極めて重要であると考えられているが、血管新生の詳細な分子メカニズムは未だ明らかにされていない。本研究では、歯胚血管新生過程における調節因子を同定し、経時的発現状況を解析することを目的とした。【方法】我々は、血管新生過程における各種調節因子に対する抗体を用いて免疫組織化学的に歯胚領域連続切片の染色を行い解析を行うとともに血管新生過程における各種調節因子のプローブを作製し、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて各種遺伝子の経時的発現状況についても解析を行った。【結果】数種類の血管新生調節因子は、歯胚発生過程において時期特異的に歯胚周囲の間葉細胞、歯乳頭および血管周囲に発現が確認された。また各種血管新生調節因子の遺伝子に関しても歯胚周囲の間葉細胞および歯乳頭において発現が認められた。【結論】本研究において、歯胚発生過程における血管新生調節する可能性のある因子の時期特異的発現が認められた。*本研究は、日本学術振興会科研費助成番号 22592052 および 26462800 によってサポートされております。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Identification of regulatory factors of angiogenic blood vessel growth in tooth germ

○Sunohara M, Seki S, Sato I

Dept Anat, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Objective: Angiogenesis is crucial for fetal development, but the molecular mechanism of angiogenic blood vessel growth has not become clear. The aim of this study was to identify regulatory factors of angiogenic blood vessel growth and analyze the expression patterns of them in tooth germ development. **Methods:** We stained serial sections of mouse whole embryos immunohistochemically with the antibody against the regulatory factors of angiogenic blood vessel growth. At the same time, we performed *in situ* hybridization analysis using the probes of them and analyzed the expression patterns of them. **Results:** Localization of the regulatory factors of angiogenic blood vessel growth were observed in dental papilla and mesenchymal layers. And also the stage-specific expression patterns were observed around the blood vessels during tooth germ development. **Conclusion:** In conclusion, we confirmed the some regulatory factors might have involved in angiogenic blood vessel growth in tooth germ. *This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Numbers 22592052, 26462800.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-147 Smad4 と NF- κ B/p65 の会合領域の同定

○浦田真梨子^{1,2}, 松原 琢磨¹, 竹内 弘³, 中富 千尋¹, 平田-土屋 志津⁴, 古株彰一郎¹, 張 皿⁵, 北村 知昭², 自見英治郎¹

¹九歯大 分子情報生化学

²九歯大 保存

³九歯大 口腔応用薬理

⁴広大院医歯薬保 歯髄生物

⁵九歯大 口腔病態病理

近年、骨形成誘導能をもつサイトカイン Bone Morphogenetic Protein (BMP) は骨欠損部への臨床応用が期待されているが、未だ十分な効果は得られていない。近年、炎症反応、細胞増殖やアポトーシス等に関与する遺伝子の発現を調節する転写因子 NF- κ B を阻害すると BMP 誘導性の骨芽細胞分化や骨形成が亢進することが報告されている。我々も NF- κ B の p65 サブユニットの TA2 領域が BMP シグナルの伝達分子 Smad4 の MH1 領域と会合することで BMP による骨形成誘導能を阻害することを報告した。そこで、Smad4 と p65 の結合領域について更なる詳細な解析を試み、その結合に必須のアミノ酸配列を同定し、将来的に NF- κ B に Smad4 と競合的に結合して、NF- κ B による BMP 抑制を阻害することで骨形成を促すペプチドの開発を目的とした。Smad4-MH1 の p65 との会合領域を同定する為、FLAG-tag を付加した p65 を COS-7 細胞に遺伝子導入し、Smad4-MH1 領域の全長 (1-138) および欠失変異体のリコンビナントタンパク質 (1-105, 1-68, 69-104) を用いて免疫沈降法を行った。その結果、1-105 さらに 69-104 番目では MH1 全長と同様に p65 との結合が認められるのに対して、1-68 番目では結合が認められなかった。すなわち Smad4MH1 ドメインはアミノ酸 69 番目から 104 番目までの領域で NF- κ B p65 と結合している可能性が示唆された。今後、この Smad4-MH1 69-104 の領域に着目し、p65 との会合領域を更に絞り込み、BMP による骨芽細胞分化を亢進するようなペプチドを作製する。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Identify of binding region of Smad4 and NF- κ B/p65

○Urata M^{1,2}, Matsubara T¹, Takeuchi H³, Nakatomi C¹, Hirata-Tsuchiya S⁴, Kokabu S¹, Chou B⁵, Kitamura C², Jimi E¹

¹Div Mol Signal Biochem, Kyushu Dent Univ

²Div Endodont Restorative Dent, Kyushu Dent Univ

³Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ

⁴Dept Biol Endod, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

⁵Div Pathol, Kyushu Dent Univ

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are most studied of the bone regeneration molecules and have applied for bone regeneration in human. However, BMPs have not demonstrated adequate clinical utility in this context due to their high cost and the requirement of large amounts for treatment. Recent findings have shown that inhibition of NF- κ B stimulates BMP-induced osteoblast differentiation and bone formation. We have demonstrated that NF- κ B inhibits BMP-induced osteoblast differentiation by suppressing DNA binding of Smads due to interaction of TA2 domain of p65 with MH1 domain of Smad4. To identify the region of MH1 domain of Smad4 required for association with p65, we analyzed the interaction of FLAG-tagged p65 with truncation mutants of MH1 of Smad4. p65 associated with MH1 fragments 1-138, 1-105, 69-104, but not 1-68, indicating that the interaction region lies between 69-104. These results suggest that targeting the association between p65 and Smad4 help promote bone regeneration for treatment of bone diseases.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-148 PRIP の卵胞機能における役割

○松田 美穂, 平田 雅人

九大 院歯 口腔細胞工学

PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein) は、酵素活性を有しない情報伝達分子である。PRIP 欠損 (KO) 雌マウスでは、出産仔数の低下及び性腺刺激ホルモンや性ステロイドホルモンの分泌異常を示した事から骨組織への影響について解析した。その結果、海綿骨の骨量増加が認められ、PRIP が骨芽細胞分化において抑制的に機能する事が判明した。一方、生殖機構の解析を進め、卵巣機能における PRIP の役割を検討した。野生型 (WT) 及び KO 雌マウスにおいて過排卵処理を施し排卵数を調べたところ、その数は KO で WT の約 20% 程度であった。排卵に必須の Cumulus-oocyte-complex (COC) (卵丘細胞-卵子複合体) の膨潤能を検討したところ、黄体形成ホルモン (LH) サージ様の薬剤刺激により KO でも正常な COC 複合体の膨潤が認められた。遺伝子発現変化を microarray 及び real-time PCR で解析したところ、排卵前後で排卵関連遺伝子群に顕著な発現量増加が見られたが、WT と KO で有意差はなかった。以上より、PRIP 欠損は排卵に至る卵胞成熟過程に影響する事が示唆された。組織学的解析から、KO の卵巣では出血を伴った嚢胞がしばしば見られ、卵胞成熟誘発後でも未成熟卵胞が多くて成熟卵胞・黄体は少なかった。また、成熟卵胞の顆粒膜細胞に発現する LH 受容体が、KO では未成熟卵胞でも見られ、その発現量及び LH 受容体下流のシグナル分子のリン酸化が亢進していた。更に、KO で血中エストロゲン (E2) 濃度は低下していたが、卵巣内の残存 E2 量は多く、産生量は WT と同等であることが推定された。以上の結果から、PRIP 欠損は卵巣において LH シグナルの亢進及び E2 分泌の低下を惹起して早期の卵胞成熟過程が抑制されると考えられた。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Involvement of phospholipase C-related, but catalytically inactive protein (PRIP) in ovarian function

○Matsuda M, Hirata M

Sect Mol Cell Biochem, Kyushu Univ Grad Sch Dent

PRIP was identified as an inositol-1,4,5-trisphosphate binding protein, comprising type1 and 2, whose gene ablation impaired female fertility manifested by decreased number of pups, longer estrous days and increased secretion of gonadotropins. Herein, we investigated the involvement of PRIP in fertility through ovary. Superovulation assay revealed the remarkable decrease of the ovulated oocyte and multiple cystic follicles in ovaries of PRIP-1 and -2 double knockout (DKO) mice. Cumulus oocyte complex-expansion analysis showed little difference between wild type (WT) and DKO. Gene expression analysis revealed the increased expression of molecules involved in ovulation process by artificial gonadotropin stimulation, but there was little difference between WT and DKO mice. Histological analysis of the ovaries revealed more immature follicles and fewer corpus lutea in DKO ovaries. The promoted expression of luteinizing hormone receptors (LHR) at early stages of follicle development was observed in DKO ovaries. The phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), a downstream target of LH-LHR signaling, was enhanced in DKO granulosa cells. Serum level of estradiol was lower in DKO mice without affecting the production. These results suggest that PRIP is involved in follicle development at the early stages through the regulation of LH signaling and estradiol secretion.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-149 SNARE 複合体形成と開口分泌調節における SNAP-25 リン酸化の役割

○高 靖¹, 平田 牧子¹, 溝上 顕子¹, 竹内 弘², 平田 雅人¹

¹九大 院歯 口腔細胞工学

²九歯大 口腔応用薬理

SNARE 複合体は syntaxin, SNAP-25, VAMP よりなるが, それらのタンパク質のリン酸化によって開口分泌は調節される. PKA および PKC による SNAP-25 のリン酸化による調節はよく知られているが, リン酸化された SNAP-25 の SNARE 複合体の形成における役割は明らかではない. そこで, 本研究では, SNAP-25 の PKA および PKC によるリン酸化の SNARE 複合体の形成に及ぼす影響を検討した. 精製した SNAP-25, syntaxin-1, VAMP-2 を用いた実験の結果, *in vitro* において SNARE 複合体の形成は PKA による SNAP-25 の Thr¹³⁸ のリン酸化によって抑えられ, PKC による Ser¹⁸⁷ のリン酸化によって促進された. また, PC12 細胞における SNARE 複合体形成は PKA 活性化剤であるホルスコリン刺激によって阻害され, PKC の活性化剤である PMA によって促進された. 高カリウムイオン刺激による PC12 からのノルアドレナリン分泌は, ホルスコリン, PMA いずれの刺激によっても増加した. SNAP-25 を欠損させた PC12 細胞では高濃度カリウムイオン刺激によるノルアドレナリン分泌は抑制されたが, そこに野生型 SNAP-25 の遺伝子を導入するとノルアドレナリン分泌能が回復した. SNAP-25 を欠損させた PC12 細胞に SNAP-25 のリン酸化されない変異体である T138A または S187A 変異体を発現させても高濃度カリウムイオン刺激による分泌応答は回復したが, ホルスコリン刺激による分泌増強は野生型 SNAP-25 を発現させたもの比べて T138A 変異体を発現させた細胞においてより明白に認められた. 一方, S187A を発現させた細胞における PMA の効果は野生型を発現させたもの比べて抑えられていた. 以上のことから, PKA および PKC による SNAP-25 のリン酸化は SNARE 複合体の形成を, それぞれ抑制的, あるいは促進的に調節し, PC12 細胞における開口分泌を効果的に調節していることが示唆された.

【利益相反】 利益相反状態にはありません.

Regulation of SNARE complex formation and exocytosis by phosphorylation of SNAP-25 in PC12 cells

○Gao J¹, Hirata M¹, Mizokami A¹, Takeuchi H², Hirata M¹

¹Sect Mol Cell Biochem, Kyushu Univ Grad Sch Dent

²Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ

Membrane fusion is mediated by formation of the SNARE complex by syntaxin, SNAP-25, and VAMP. The physiological role of SNAP-25 phosphorylation in exocytosis, in particular with regard to SNARE complex formation, has remained elusive. SNARE complex formation by purified recombinant SNAP-25, syntaxin-1, and VAMP-2 *in vitro* was inhibited or promoted as a result of the phosphorylation at Thr¹³⁸ by PKA or at Ser¹⁸⁷ by PKC, respectively. SNARE complex formation in intact PC12 cells was similarly inhibited by forskolin (activator of PKA) and promoted by PMA (activator of PKC). Noradrenaline secretion from PC12 cells induced by a high K⁺ concentration was enhanced by forskolin or PMA. Stable depletion of SNAP-25 inhibited high-K⁺-induced noradrenaline secretion. Forced expression of WT SNAP-25 restored the secretory response of the SNAP-25-depleted cells to high-K⁺. Expression of the nonphosphorylatable T138A or S187A mutants of SNAP-25 similarly rescued the secretory response to high-K⁺, but the augmentation of this response by forskolin was more pronounced in the cells expressing SNAP-25 (T138A), whereas that by PMA was less pronounced in those expressing SNAP-25 (S187A). Our results thus suggest that SNAP-25 phosphorylation by PKA or PKC contributes differentially to the control of exocytosis in PC12 cells by regulating SNARE complex formation.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-150 蛍光イメージングを用いた時計タンパク質の細胞内動態の解析

○西出 真也

北大 院医 細胞生理

唾液分泌や睡眠覚醒など多くの生理機能は約 24 時間周期の概日リズムを示す。個体としての概日リズムは、自律的に振動する全身の細胞のリズムが統合されることにより形成される。個々の細胞の概日リズムは、時計遺伝子 Clock, Bmal1, Per, Cry を中心とする遺伝子群の周期的な転写、翻訳、翻訳後修飾から構成される負のフィードバックにより生じる。中でも転写因子 CLOCK-BMAL1 二量体は標的分子の転写量を約 24 時間周期で制御することにより中心的な役割を果たす。本研究では CLOCK および BMAL1 の蛍光タンパク質融合タンパク質を作製し、生きた細胞内における局在を可視化した。CLOCK のほとんどは従来報告されている通り核に局在したが、一部の分画が細胞質に局在した。また、細胞内小器官マーカーを用いて検証を行った結果、細胞質に局在する CLOCK は小胞体へ集積することが明らかになった。CLOCK の様々な部分欠失変異タンパク質を作製した局在解析により小胞体移行に必要と考えられる領域を同定した。また変異型 CLOCK の細胞内局在および BMAL1 との二量体形成は欠失させた領域依存的に変化した。以上よりこれまで知られていなかった CLOCK の小胞体局在が明らかになり、小胞体機能の 24 時間周期の変動に参与する可能性が示唆された。本研究は大場雄介（北大 院医 細胞生理学分野、以下同じ）、南保明日香、藤岡容一郎との共同研究である。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Fluorescence bioimaging of intracellular dynamics of the clock proteins

○Nishide S

Dept Cell Physiol, Hokkaido Univ Grad Sch Med

Circadian rhythms are crucial factors in the regulation of a wide range of physiological processes, including the salivary secretion and the sleep-wake cycle. The systemic circadian system can be broken down into cellular rhythms, which are maintained by periodic changes in the status of a set of clock genes and proteins. Such proteins oscillate not only at the levels of their expression but also at those of posttranslational modification. In this study, we have constructed fluorescent biosensors for clock proteins, CLOCK, and BMAL1, and observed their subcellular localization, mobility, and interaction in living cells. CLOCK localized in the cytosol as well as the nucleus, and cytosolic CLOCK accumulated in the endoplasmic reticulum (ER). Deletion of N- or C-terminus of CLOCK changed its subcellular distribution and colocalization with the ER marker in a deleted region-dependent manner. Dimerization of CLOCK and BMAL1 was also reduced by deletion of CLOCK. In conclusion, we here unveil that the clock protein CLOCK localizes at the ER and seems to rhythmically regulate ER functions. This research has been conducted with Drs. Yusuke Ohba, Asuka Nanbo and Yoichiro Fujioka (Hokkaido Univ).

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-151 リン酸水素イオンは bisphosphonate の骨芽細胞内取り込みを増加させる

○田島 雅道, 坂上 宏

明海大 歯 薬理

【目的】 Bisphosphonates (BPs) 投与患者の一部に、抜歯後の顎骨壊死が発症しているが、その機序は未だ不明で有効な治療法も確立されていない。これまでの我々の解析によって、リン酸水素ナトリウムの濃度上昇が BPs の骨芽細胞障害を顕著に増強させることが判明したので、その作用機序の解析を行った。**【方法】** 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いて、BPs の細胞障害機序を調べた。細胞増殖活性の測定は WST-8 を用い、アポトーシスの評価は CellEvent caspase 3/7 により行った。また、ミトコンドリア膜電位の変化は JC-1 の蛍光測定で行い、細胞内活性酸素 (ROS) 測定は CM-H₂-DCFDA を用いて、励起光の反復照射によって生成される ROS 量の経時的変化から、その応答性を評価した。BPs の細胞内取り込みは、蛍光標識した pamidronate を用いた。**【結果】** BPs は MC3T3-E1 の細胞増殖を濃度依存的に阻害した。BPs はミトコンドリアの膜電位を上昇させ ROS 生成応答を抑制したが、その後 caspase 3 を活性化した。リン酸水素ナトリウムやリン酸水素カリウムは、BPs の細胞障害を増強させ、同時に BPs の細胞内取り込みが顕著に亢進していることを確認した。一方、pyrophosphate は BPs の細胞内取り込みを阻害することで、この細胞内障害を抑制していることを確認した。**【考察】** リン酸水素イオン濃度の上昇は BPs の細胞内取り込みを促進させて、BPs による骨芽細胞障害を増強させている可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Hydrogen phosphate ion increases the uptake of bisphosphonate into osteoblastic cells

○Tajima M, Sakagami H

Div Pharmacol, Dept Diagn Ther Sci, Meikai Univ Sch Dent

Extracting teeth of patients treated with bisphosphonates (BPs) occasionally induces the necrosis of jaw, but the cause of disease is still unclear. We found that sodium hydrogen phosphate enhances the cytotoxicity of osteoblast induced by BPs. In the present study, we investigated the enhancing mechanism of phosphate. MC3T3-E1 cells were used as osteoblastic cells. The proliferation of cells was assayed by WST-8. Apoptosis was evaluated by CellEvent caspase 3/7. Membrane potential of mitochondria was observed using the fluorescence image of JC-1. The alteration of intracellular reactive oxygen species (ROS) was evaluated by the fluorescence image of CM-H₂-DCFDA. The uptake of BPs into the cells was evaluated by fluorescent pamidronate. BPs dose-dependently inhibited the growth of MC3T3-E1. BPs increased the membrane potential of mitochondria, and suppressed the productive response of intracellular ROS induced by oxidative stress. And caspase 3 was activated and cell death was induced. The addition of sodium hydrogen phosphate enhanced the BPs-induced damage of MC3T3-E1 cells, and simultaneously it increased the uptake of BPs into the cells. But pyrophosphate suppressed the uptake of BPs and the cytotoxicity. These results suggest that hydrogen phosphate ion may enhance the BPs-induced osteoblastic damage by the increasing intracellular uptake of BPs.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-152 ドキソルビシンのヒト口腔ケラチノサイトに対する傷害性を緩和する物質の探索

○坂上 宏¹, 奥平 准之¹, 天野 修², 横瀬 敏志³

¹明海大 歯 薬理

²明海大 歯 解剖

³明海大 歯 歯内

【目的】我々は、アントラサイクリン系の抗悪性腫瘍薬ドキソルビシン(DXR)が、ヒト正常口腔間葉系細胞(歯肉線維芽細胞, 歯髓細胞, 歯根膜線維芽細胞)と比較し、ヒト口腔扁平上皮癌細胞をより強く傷害するため、高い腫瘍選択性を与えることを報告してきた。しかし、最近、DXRは、正常口腔上皮系細胞(初代歯肉前駆上皮細胞, ケラチノサイト)に対しても非常に高い傷害性を示すことが見出された。今回、DXRにより上皮系細胞に誘導される細胞死のタイプの同定、そして、それを緩和する薬剤の検索を行った。【材料と方法】生細胞数はMTT法により、細胞な微細構造は、グルタルアルデヒド固定後透過型電子顕微鏡下で観察することにより、細胞死関連タンパク質の発現はwestern blot法により解析した。【結果】DXRに対する感受性の強さは、細胞密度の多少に関わらず、口腔扁平上皮癌>上皮系正常細胞>間葉系上皮細胞の順であった。DXRは、ケラチノサイトにアポトーシスに特徴的な微絨毛の消失、クロマチンの凝集、核の断片化を誘導した。レスベラトロールは、上皮系細胞死を若干抑制した。【考察】ケラチノサイトは増殖が遅くオートファジーにより生存を維持しており、抗癌剤の毒性によりアポトーシスに陥る可能性が示唆された。この系は、臨床で用いられている各種抗癌剤の副作用を克服する物質の網羅的な探索に有用と思われる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Search for substances that alleviate the toxicity of doxorubicin against human oral keratinocyte

○Sakagami H¹, Okudaira N¹, Amano O², Yokose S³

¹Div Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent

²Div Anat, Meikai Univ Sch Dent

³Div Endod, Meikai Univ Sch Dent

Purpose: We have previously reported that doxorubicin (DXR), anthracyclin anticancer drug, showed higher cytotoxicity against human oral squamous cell carcinoma cell lines, as compared with normal human mesenchymal normal oral cells (gingival fibroblast, periodontal ligament fibroblast, pulp cell), yielding high tumor-specificity. However, we also recently found that DXR showed also higher cytotoxicity against human normal oral epithelial cells (oral keratinocyte, gingival epithelial cell). In the present study, we investigated what type of cell death was induced by DXR in normal oral keratinocyte, and searched for substance that alleviates the DXR-induced cytotoxicity in keratinocytes. **Materials & Methods:** Viable cell number was determined by MTT method, fine cell structure by transmission electron micrograph and expression of cell-death related proteins by western blot analysis. **Results:** The sensitivity against doxorubicin was in the order of oral squamous cell carcinoma > epithelial normal cells > mesenchymal normal cells, regardless of cell density. DXR induced apoptosis-related phenotypes (loss of cell surface microvilli, chromatin condensation, nuclear fragmentation) in keratinocytes. Resveratrol alleviated the DXR-induced cytotoxicity. **Conclusion:** DXR may induce apoptosis in oral keratinocytes that keep steady-state viability by autophagy. The present system may be useful for the comprehensive investigation that search for substances that reduces the cytotoxicity of anticancer drugs.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-153 ヒト歯髄幹細胞とヒト歯根膜細胞の分化能へのアスピリン作用の解析

○筒井 健夫¹, 小林 朋子¹, 鳥居 大祐¹, 松井美紀子¹, 中原 貴²

¹日歯大 生命歯 薬理

²日歯大 生命歯 発生・再生

【目的】 アスピリンは広く処方されている非ステロイド性抗炎症薬であり、また骨誘導を促進する。我々はヒト歯髄幹細胞(hDPSCs)とヒト歯根膜細胞(hPDLCs)の分化能へのアスピリン作用を解析した。

【方法】 hDPSCsは *in vitro* では細胞増殖能, RT-PCR, 石灰化分化能と脂肪分化能を解析し, *in vivo* ではヌードマウスへの皮下移植による組織学的検査を行った。また, hPDLCsとヒト不死化歯根膜細胞(hIPDLCs)についてはRT-PCRによるmRNA発現, 石灰化分化能と脂肪分化能を解析した。アスピリンは細胞増殖能と分化能の解析において2.5 µg/mlと50 µg/mlで作用させた。

【結果】 hDPSCsはRT-PCRより *Oct3/4*, *Nanog*, *Alkaline phosphatase*, *CD146*, *CD133*, *Collagen type I*, *Bone sialoprotein* が解析され, 皮下移植による組織学的検査より象牙質/歯髄様複合体が観察された。細胞増殖曲線は各濃度による差は認められなかったが, 50 µg/ml作用群においてアリザリンレッド陽性像が顕著であった。また, 脂肪分化誘導では50 µg/ml作用群において早期にOil red O陽性像が観察された。hPDLCsおよびhIPDLCsでは, RT-PCRより *F-Spondin* と *Periostin* が解析された。アリザリンレッド陽性像は各濃度による差が認められなかったが, hPDLCsとhIPDLCs共に50 µg/ml作用群において早期にOil red O陽性像が観察された。

【考察】 アスピリンの作用により, hDPSCsにおいては早期に石灰化と脂肪分化が誘導され, hPDLCsおよびhIPDLCsでは早期に脂肪分化が誘導された。本実験の結果より, アスピリンを用いた分化誘導による再生医療の可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Analyzed aspirin induced differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human periodontal ligament cells (hPDLCs)

○Tsutsui T¹, Kobayashi T¹, Torii D¹, Matsui M¹, Nakahara T²

¹Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

²Dept Dev Regen Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Purpose: Aspirin is a commonly used as a nonsteroidal anti-inflammatory agent and in enhanced osteogenesis. We analyzed if differentiations are induced treating aspirin with human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human periodontal ligament cells (hPDLCs).

Materials & Methods: hDPSCs characterized by cellular growth assay, alizarin red staining, Oil red O staining and RT-PCR *in vitro*. In addition, histological definition methods characterized transplanted cells *in vivo*. Moreover, hPDLCs and immortalized human periodontal ligament cells (hIPDLCs) characterized by alizarin red staining, Oil red O staining and RT-PCR *in vitro*. 2.5 µg/ml and 50 µg/ml aspirin treated for cellular growth and differentiation assays.

Results: RT-PCR assay of hDPSCs showed *Oct3/4*, *Nanog*, *Alkaline phosphatase*, *CD146*, *CD133*, *Collagen type I*, *Bone sialoprotein* expression and transplanted revealed dentin/pulp-like structures. Cultured in osteogenic and adipogenic differentiation medium, prompt positive staining revealed in treated with 50 µg/ml aspirin. *F-Spondin* and *Periostin* mRNA were expressed by RT-PCR in hPDLCs and hIPDLCs. When cultured in adipogenic medium, prompt positive staining revealed in treated with 50 µg/ml aspirin.

Conclusion: Our results support that aspirin induce prompt differentiation in hDPSCs, hPDLCs and hIPDLCs. Aspirin may be useful candidate for induce differentiation medicine of regenerative therapy.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-154 NSAIDsの骨芽細胞分化におけるCOX活性阻害非依存的効果の検討

○松山 篤史^{1,2}, 東 泉², 大住 伴子², 諸富 孝彦¹, 鷺尾 絢子¹, 北村 知昭¹,
竹内 弘²

¹九歯大 保存

²九歯大 口腔応用薬理

【目的】非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は, シクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害することにより, 解熱, 鎮痛, 抗炎症作用を現す一方, その他の標的を介した作用も少なくない. 本研究では, NSAIDs の新規標的の同定を目指し, 骨芽細胞分化を指標に NSAIDs の COX 阻害以外の効果の有無について検討した. 【方法】マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 は 10 mM β-グリセロリン酸, 50 μg/ml アスコルビン酸を添加した培地により分化を誘導し, 誘導 7 日目に ALP 活性を測定して骨芽細胞分化の指標とした. 各 NSAIDs は, 分化誘導培地交換時に添加して影響を調べた. NSAIDs の細胞内シグナル経路への影響は MC3T3-E1 及びマウス筋芽細胞株 C2C12 を用いて検討した. insulin や BMP-2 で 10 分間刺激した細胞の溶解液を調製し, 抗リン酸化抗体 (Akt, ERK, Smad) を用いたウエスタンブロット法により解析した. NSAIDs は刺激 1 時間前に細胞に添加した. 【結果】MC3T3-E1 の骨芽細胞分化において celecoxib 及び valdecoxib は分化に伴う ALP 活性の上昇を抑制した. COX 阻害活性を持たない celecoxib 誘導体 2,5-dimethyl (DM)-celecoxib も ALP 活性の上昇を抑制した. C2C12 において celecoxib および DM-celecoxib は BMP-2 刺激によって惹起される Smad のリン酸化を抑制した. 【考察】celecoxib は他の NSAIDs と比較して, 骨芽細胞分化を強く抑制した. COX 阻害活性の低い誘導体 DM-celecoxib も骨芽細胞分化抑制効果を有していた. celecoxib は他の COX 活性阻害作用に非依存的な作用機序を有することが示唆された.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osteoblastic differentiation

○Matsuyama A^{1,2}, Higashi S², Ohsumi T², Morotomi T¹, Washio A¹, Kitamura C¹,
Takeuchi H²

¹Div Endodont Restorative Dent, Kyushu Dent Univ

²Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are commonly prescribed drugs in dental practice to managing pain and swelling. The mechanism of action is primarily inhibiting cyclooxygenase (COX), and therefore suppressing prostaglandin synthesis. Recently, it is widely accepted that some of NSAIDs has more role other than pain control, such as suppressing tumor cell growth, independent of COX-inhibiting activity. Thus, in order to identify a novel target of NSAIDs, we examined the effect of several NSAIDs in differentiation of osteoblast. C2C12 cells and MC3T3-E1 cells were induced osteoblastic differentiation by incubating in the growing medium containing ascorbic acid and beta-glycerophosphate in the presence or absence of a series of NSAIDs for 7 days. Osteoblastic differentiation of the cells was assessed by measuring alkaline-phosphatase activity. Phosphorylation of signaling molecules was detected by western blotting using phospho-specific antibodies against each protein. Celecoxib and valdecoxib strongly inhibited osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells. Moreover, 2,5-dimethyl (DM)-celecoxib, a celecoxib analogue that does not inhibit COX activity, also inhibited osteoblastic differentiation of the cells. Celecoxib and DM-celecoxib suppressed phosphorylation of Smad 1/5 induced by BMP-2 in C2C12 cells. Further studies leads to more effective usage by estimating the risk mediated through those new targets.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-155 新規 K_{ATP} チャンネル開口薬 ZD0947 の平滑筋型 K_{ATP} チャンネルに対する効果

○森 啓輔, 合島怜央奈, 檀上 敦, 山下 佳雄
佐賀大 医 歯科口外

ATP感受性 K⁺チャンネル (K_{ATP}チャンネル) は内向き整流性 K⁺チャンネル (Kir6.X) とスルホニルウレアレセプター (SUR) の2種類のサブユニットから構成されるヘテロ構造体である。SUR1/Kir6.2は膵臓のβ細胞に、SUR2A/Kir6.2は心筋に、SUR2B/Kir6.2は平滑筋に主に認められる。それらは類似の電気生理学的な特性を持つが、K_{ATP}チャンネル開口薬には異なる反応を示す。本研究では新規 K_{ATP}チャンネル開口薬である ZD0947 の各々の K_{ATP}チャンネルに対する薬理作用を電気生理学的手法を用いて解析した。実験には異なるサブユニットの組み合わせの K_{ATP}チャンネル (SUR1/Kir6.2, SUR2A/Kir6.2 および SUR2B/Kir6.2) と GFP を組み合わせて遺伝子導入試薬により共発現させた HEK293 細胞に対してパッチクランプ法を用いて評価した。本研究では(1)ZD0947 の各々のチャンネルに対する開口作用および(2)K⁺チャンネル開口薬 (ジアゾキサイドまたはピナジジル) 存在下において活性化させた各々のチャンネルに対する ZD0947 の薬理作用を評価した。その結果、ZD0947 は SUR1/Kir6.2 の活性化を誘発しなかったが、SUR2A/Kir6.2 に対して弱活性化を誘発し、SUR2B/Kir6.2 に対しては濃度依存性にチャンネル活性を誘発した。また、活性化された各々のチャンネルに対して、ZD0947 は SUR1/Kir6.2 に対してのみ抑制作用を示した。このように ZD0947 は単独では SUR2B/Kir6.2 に対しては活性化作用を示した、一方で、すでに活性化されている SUR1/Kir6.2 に対してのみ抑制作用を示した。これらの結果から ZD0947 は K_{ATP}チャンネルを構成している SUR のサブタイプに依存し、異なる薬理作用を有することが示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Effects of ZD0947, a novel and potent ATP-sensitive K⁺ channel opener, on smooth muscle-type ATP-sensitive K⁺ channels

○Mori K, Aijima R, Danjo A, Yamashita Y

Dept Oral and Maxillofac Surg, Fac Med, Saga Univ

The effects of ZD0947, a novel ATP-sensitive K⁺ channel opener, on the activity of reconstituted K_{ATP} channels were investigated using cell-attached recordings. K_{ATP} channels are co-expressed with an inwardly rectifying 6 family K⁺ channel subunit and three different types of sulphonylurea receptors (SUR1, SUR2A and SUR2B) in HEK 293 cells. Although application of ZD0947 did not induce the activity of SUR1/Kir6.2 channels, ZD0947 caused a weak activation of SUR2A/Kir6.2 channels. ZD0947 induced the activity of SUR2B/Kir6.2 channels in a concentration-dependent manner. ZD0947 reversibly suppressed the diazoxide-induced SUR1/Kir6.2 channels. However, ZD0947 did not affect the fully activated SUR2A/Kir6.2 or SUR2B/Kir6.2 channels by pinacidil. Similarly, ZD0947 also possessed no inhibitory effects on the channel activity of Kir6.2ΔC26, a truncated isoforms of Kir6.2 and its mutant channel (Kir6.2ΔC26C166A). ZD0947 induced the activity of SUR2B/Kir6.1 channels, showing a concentration-dependent activation. Thus ZD0947 is an antagonist of pancreatic type-K_{ATP} channels (SUR1/Kir6.2 channels), although ZD0947 is a relatively effective to smooth muscle type-K_{ATP} channels (i.e. SUR2B/Kir6.1 channels and SUR2B/Kir6.2 channels). These results suggest that a pharmacological agent can possess either agonistic or antagonistic action on the activity of K_{ATP} channels, depending upon a subtype of SUR.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-156 18 α -グリチルレチン酸は薬物性歯肉肥厚患者由来の線維芽細胞の増殖を抑制する

○竹内 麗理¹, 松本 裕子², 平塚 浩一¹

¹日大松戸歯 生化・分子生物

²日大松戸歯 薬理

【目的】本研究の目的は薬物性歯肉肥厚の薬物療法の確立である。本疾患の発症機序は炎症環境下でのアポトーシスおよび細胞周期異常による歯肉線維芽細胞数の増加と報告されている。本研究では、抗炎症効果や細胞増殖抑制効果をもつ18 α -グリチルレチン酸を用いて、培養歯肉線維芽細胞のアポトーシス・細胞周期制御に対する効果を検討した。【方法】薬物性歯肉肥厚患者由来の歯肉線維芽細胞を1%血清含有DMEM中で、10 μ Mの18 α -グリチルレチン酸で刺激し、24時間後、細胞周期分布をフローサイトメトリー法、カスパーゼ活性をELISA法、アポトーシス・細胞周期制御タンパク質発現をウエスタンブロット法にて測定し、さらにヘキスト染色にてアポトーシス細胞を形態学的に観察した。また、刺激後48時間でのアポトーシス細胞数をELISA法により測定した。【結果と考察】18 α -グリチルレチン酸は歯肉線維芽細胞においてDNA合成を阻害し、細胞周期G0/G1期細胞およびSub-G1（アポトーシス）細胞数を増加し、生細胞数を減少させた。さらに、18 α -グリチルレチン酸はタンパク質Bcl-xL, Bcl-2, Procaspase-3, Cyclin A, Cyclin D1, Cdk2, Cdk6, phospho-Rb (ser780・ser807/811)の発現を抑制し、Cytosolic Cytochrome c, Cleaved Caspase-3 (p17・p19), p27の発現を亢進した。また、Caspase-3活性, Caspase-9活性が亢進した。これらの結果から、18 α -グリチルレチン酸は歯肉線維芽細胞の増殖を抑制することで、薬物性歯肉肥厚の薬物療法に応用可能であると考えられた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Inhibition of growth in fibroblasts isolated from patients with gingival overgrowth using 18-alpha-glycyrrhetic acid

○Takeuchi R¹, Matsumoto H², Hiratsuka K¹

¹Dept Biochem Mol Biol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

²Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Introduction: This investigation aimed to establish the basis of a pharmacotherapy for nifedipine-induced gingival overgrowth. In this study, we investigated the effects of 18 α -glycyrrhetic acid (18 α -GA) on the apoptosis and its regulators in gingival fibroblasts isolated from patients who presented with nifedipine-induced gingival overgrowth. **Methods:** Gingival fibroblasts were cultured in medium containing 1% FBS with/without 10 μ M 18 α -GA. At 24 h after treatment, the levels of apoptotic protein expression and caspase activity were assessed by the western blotting and the ELISA, respectively. At 48 h after treatment, the relative apoptotic cell numbers and morphological characteristics of the cells undergoing apoptosis were measured by the absorptiometry and the fluorescence staining, respectively. **Results and Discussion:** 18 α -GA significantly increased the number of apoptotic cells. Nuclear condensation and fragmentation of the cells into small apoptotic bodies appeared in the fibroblasts treated with 18 α -GA. In addition, 18 α -GA significantly increased the protein levels of cytosolic cytochrome c, pro-caspase-3, and cleaved caspase-3 and the activities of caspase-3 and caspase-9, significantly decreased Bcl-xL and Bcl-2, and thereby induced the apoptosis in gingival fibroblasts. In conclusion, 18 α -GA may be used as a pharmacotherapy for nifedipine-induced gingival overgrowth.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-157 Mg, Ca 及び Zn は独立してヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ活性を促進する

○半谷 純一, 鈴木 邦明, 南川 元, 吉村 善隆

北大 院歯 細胞分子薬理

【目的】ヒトアルカリ性ホスファターゼ (ALP) は骨型を含む臓器非特異型と小腸型, 胎盤型及び胚細胞型の3つの特異型アイソザイムに分類されている. 近年, X線結晶構造解析により, ヒト胎盤型 ALP に1つずつの Mg, Ca 及び2つの Zn 結合部位の存在が報告されたが, 各元素の機能には不明な点が多い. そこでヒト骨型 ALP 活性における Mg, Ca 及び Zn の役割を明らかにすることを目的に本研究を行った. 【方法】酵素は CALZYME 社製のヒト骨型 ALP, 基質はパラニトロフェニルリン酸 (*p*NPP) 及びナトリウムピロリン酸 (Na-PPi) を用いた. 酵素反応により生じた無機リンは Chifflet 法でモリブデンリンとして発色させた後, 分光光度計で測定し活性を算出した. 【結果】ヒト骨型 ALP 活性は, *p*NPP 及び Na-PPi を基質として Mg, Ca 及び Zn 濃度依存性に増加し 50%活性化濃度は Zn, Ca, Mg の順に増加したが, 濃度依存曲線は基質によって異なった. Zn は低濃度では活性を促進したが, 高濃度では逆に抑制した. Mg, Ca 及び Zn の共存効果を調べると, 基質が *p*NPP あるいは Na-PPi のどちらでも Mg と Ca 及び Mg と Zn による活性は相加的であった. また, Mg と Ca 及び Zn を添加する順序を入れ替えて活性を測定しても, 同様の相加的な活性が観察された. しかし Ca と Zn だけの組み合わせでは活性の相加性は認められなかった. 【考察】ヒト骨型 ALP において, Mg, Ca 及び Zn は独立して活性を促進することが示唆された.

【利益相反】利益相反状態にはありません.

Mg, Ca and Zn could promote human bone type alkaline phosphatase activity independently

○Hanya J, Suzuki K, Minamikawa H, Yoshimura Y

Dept Mol Cell Pharmacol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Objectives: One Mg and Ca, and two Zn binding sites per one subunit of human placenta type alkaline phosphatase (ALP) were detected by analysis of the crystal structure. As there were few reports about the function of each ion in the human bone type ALP activity, we examined ALP activities under Mg, Ca and Zn presence. **Methods:** We used commercial human bone type ALP as enzymes, and *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) and sodium pyrophosphate (Na-PPi) as substrates. We assayed Pi released from substrates by the Chifflet method. **Results:** ALP activities increased in Mg, Ca and Zn concentration-dependency with use of either *p*NPP or Na-PPi. The 50% activated concentrations by each ion increased in order of Zn, Ca and Mg. The concentration dependency curve was different between *p*NPP and Na-PPi. Zn promoted the activity with the low concentration, but inhibited it at higher concentration. The activity increased additively when Mg was present in combination with Ca or Zn in random order. The additive activity was observed under either *p*NPP or Na-PPi presence. The activity, however, didn't increase additively when Ca and Zn were present in no particular order. **Conclusions:** Mg, Ca and Zn could promote human bone type ALP activity independently.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-158 分化脂肪細胞における D-dopachrome tautomerase 遺伝子の転写調節

○岩田 武男¹, 栗林 恭子², 吉本 勝彦¹

¹徳大 院医歯薬 分子薬理

²獨協医大 口腔外科

【背景・目的】 インスリン抵抗性改善作用を有するアディポカイン D-dopachrome tautomerase (DDT) は肥満者の脂肪細胞で発現が低下することから、DDT の発現調節の破綻と肥満の病態との関連が示唆される。DDT は前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化過程で発現が上昇し、前駆脂肪細胞では AMP-activated protein kinase (AMPK) が DDT の転写調節に関与する。今回は成熟脂肪細胞での DDT の転写調節機序について検討を行った。

【方法】 ヒト前駆脂肪細胞株 SGBS 細胞から分化させた脂肪細胞を用いて AMPK 活性化剤 (AICAR およびその誘導体), AMPK 阻害剤 (compound C), AMPK の下流のシグナル分子 mTOR の阻害剤 (rapamycin) の DDT 発現に及ぼす影響を検討した。さらに転写調節因子 FOXO1 の阻害剤 (AS1842856) が DDT 転写に与える影響について検討した。

【結果】 AICAR およびその誘導体は分化脂肪細胞での DDT mRNA 発現を上昇させ、compound C は低下させた。これら薬剤の効果は前駆脂肪細胞で認められるものよりも顕著であった。さらに Rapamycin は脂肪細胞での DDT mRNA 発現を上昇させた。FOXO1 阻害剤は単独では分化脂肪細胞での DDT mRNA 発現に影響を与えなかったが、AICAR およびその誘導体による DDT の mRNA 発現上昇を促進させた。

【結論】 分化脂肪細胞において AMPK の活性化および mTOR の不活性化が DDT の転写調節を促進すると考えられた。一方、FOXO1 は脂肪細胞での DDT 発現を抑制している可能性がある。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Transcriptional regulation of gene encoding D-dopachrome tautomerase in differentiated adipocytes

○Iwata T¹, Kuribayashi K², Yoshimoto K¹

¹Dept Med Pharmacol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci

²Dept Oral Maxillofac Surg, Dokkyo Med Univ Sch Med

D-dopachrome tautomerase (DDT) is an adipokine that improves insulin resistance in obesity. Its expression levels are lower in adipocytes of obese patients, suggesting that disruption of the transcriptional regulation may be a cause of insulin resistance in obesity. DDT gene expression is increased in an adipocyte differentiation-dependent manner and is enhanced by activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in preadipocytes. In this study, we investigated transcriptional regulation of DDT gene in adipocytes differentiated from SGBS cells, a human preadipocyte cell line.

We examined whether AMPK is involved in DDT mRNA expression in adipocytes as well as preadipocytes. DDT mRNA expression were increased and decreased in SGBS adipocytes treated with AMPK activators (AICAR and its derivatives) and an AMPK inhibitor (compound C), respectively. These effects were more prominent than in preadipocytes. Furthermore, rapamycin, an inhibitor of mTOR that is inhibited by AMPK activation, increased DDT mRNA expression in the adipocytes. Although a FOXO1 inhibitor, AS1842856, alone had no effect on DDT mRNA expression in SGBS adipocytes, it enhanced DDT mRNA induction by AMPK activators.

These results suggest that AMPK/mTOR pathway is involved in DDT expression and FOXO1 may inhibit DDT expression in adipocytes.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-159 2つの酷似した歯科的情報が寄せられた白骨死体の個人識別についての事例

○笠原 典夫, 中村 安孝, 永峰 史, 橋本 正次

東歯大 法歯人類

一般に歯科的個人識別（身元確認）は、遺体の口腔内検査から得られる死後の所見と、該当すると思われる人物の歯科診療録やエックス線写真等から得られる生前記録とを比較し、同一人であるか否かを鑑定する。該当者がいない場合であれば、前述の口腔内所見に加えて、骨の形態的特徴から性別や年齢、人種などの所見を得ることとなる。そして、これら提供された情報をもとに、捜査機関が該当者を検索することになる。

今回報告する白骨死体は、ほぼ全身の骨が発見されており、そのうち検査のために搬入された資料は、下顎骨を含む頭蓋一つで、後頭骨の外後頭隆起が極度に肥厚し、また上顎前歯部にのみ極度な咬耗が見られるなど、特異的な形態学的特徴を呈していた。口腔内の治療所見に関しては、歯科治療痕は多数あり、上顎左側第二小白歯が先天的欠損を有していたこと等を認め、該当者が現われれば判定は容易であると思われた。

その後の警察の捜査により、該当者と推察される人物の歯科診療録が供され、そこから得られた生前情報の特徴の多くが死後記録および検査所見と極めて酷似しており、また説明のできない明らかな矛盾も認められなかったことから該当者の可能性が高いと考えられた。しかし、その後、当該人物は生存していることが判明したため、その歯科記録上の人物とは別人であることが分かったものである。なお、本件白骨死体の身元はその後の捜査の進展により該当者が判明し、その該当者の生前の歯科記録との照合により同一人の可能性が極めて高いと判断している。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Difficulties in personal identification means of the dental records

○Kasahara N, Nakamura Y, Nagamine F, Hashimoto M

Dept Forensic Odontol Anthropol, Tokyo Dent Coll

I would like to report the interesting case which we experienced recently.

The human remains were found unknown and the skull with mandible brought to us for the detailed examinations. The morphological characteristics of the skull showed the extreme development of external occipital protuberance and severe attrition on anterior upper teeth. In addition, many dental treatments and congenital missing of upper left second premolar were observed. It seemed to be easy to identify when a possible person was appeared.

For a while, the police found a possible missing person. And then, the dental record was retrieved from the dentist who treated the missing person. Then we compared the ante-mortem and post-mortem dental records. In the result, even though most of dental findings were similar, the unknown body was not belonging to the possible person. Because further investigation by the police got the fact that possible person was alive. At last, the police found another possible person and the body was positively identified as this person. In this case, the status of each tooth written on two dental records provided by different dentist were very resemble. Therefore, we should give more attention in dental identification.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-160 微量試料からのトランスファー細胞を用いた DNA 型解析

○丸山 澄^{1,2}, 堤 博文^{1,2}, 伊澤 光^{1,2}, 小室 歳信^{1,2}

¹日大 歯 法医

²日大 総歯研 社会歯

【はじめに】法医学的微量な試料からの DNA 鑑定の精度向上を図ることを目的に、トランスファーした細胞について DNA 型検査を試みた。

【試料・方法】試料は 6 名の口腔粘膜細胞から、トランスファー装置を用いて採取した細胞を用いた。REPLI-g Single Cell Kit (QIAGEN)を用いて WGA 法を行った後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)で精製し mtDNA 型, 常染色体および Y 染色体 STR 型検出の可否について検討した。本研究は日本大学歯学部倫理委員会の承認を得ており, また, 開示すべき COI 関係にある企業・組織や団体などはない。

【結果および考察】WGA 法により DNA を増幅し DNA 型検出を行ったところ, mtDNA 型検査では細胞数 3 個であっても試料提供者本人の型が検出された。常染色体 STR 型については精製 DNA を用いたところ, 細胞数 30 個の場合でも全ての allele を検出することは困難であったが, 精製前より余計なピークは減少し, さらに判定可能であった allele 数は増加した。Y 染色体 STR 型では細胞数 15 個で全ての allele が検出された試料も認められた。mtDNA 型は細胞数が 3 個でも判定は可能であったが, STR 検査を含めた場合, mtDNA 型, 常染色体 STR 型, Y-STR 型のすべての検査の判定が可能となるには細胞は 15~20 個必要と考えられる。しかし, 法医鑑識試料は微量な試料であることが多く, より少ない細胞数で全ての検査が可能となるよう今後も検討が必要である。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

DNA analysis of cells transferred from the small amount of sample

○Maruyama S^{1,2}, Tsutsumi H^{1,2}, Izawa H^{1,2}, Komuro T^{1,2}

¹Dept Leg Med, Nihon Univ Sch Dent

²Div Social Dent, Dent Res Center, Nihon Univ Sch Dent

Individual identification is an important deciding factor for the human rights of both suspects and victims in the field of legal medicine. For this purpose, a very small amount of samples are valuable sources; however, precise discrimination of individuals from these sources is extremely difficult.

Oral mucosal cells from six volunteers were obtained by stripping the surface of the oral mucosa. A floating cells were captured with a microinjector and transferred to a PCR tube using a micromanipulator under a microscope. After amplified with a REPLI-g Single Cell Kit, Template DNA was purified with a PCR purification kit. As for template DNA, inspection of mtDNA, autosomal STR loci and Y-STR loci was conducted.

Three cells were sufficient for precise mtDNA genotyping. When using purified DNA in autosomal STR type, it has been difficult to detect all allele from 30 cells. However, unnecessary peak than before purification was reduced, further judgment possible allele number was increased. In the Y-STR type all allele was detected in 15 cells. However, as for the cell count, it is thought that 15-20 are necessary because a judgment of all inspection of mtDNA, autosomal STR and Y-STR is enabled.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-161 SureSelect システムを用いた ABO 式血液遺伝子型, ミトコンドリア DNA 型および HaloPlex 遺伝性不整脈関連心疾患リサーチパネルの同時解析

○堤 博文^{1,2}, 丸山 澄^{1,2}, 伊澤 光^{1,2}, 小室 歳信^{1,2}

¹日大 歯 法医

²日大 総歯研 社会歯

【はじめに】我々は, HaloPlex 遺伝性不整脈関連心疾患リサーチパネル (アジレント) の 19 遺伝子領域解析キットに ABO 式血液遺伝子型とミトコンドリア DNA 型を加えて, SureSelectQXT キット (アジレント) を用いて DNA を調整し, NGS・Miseq システムを用いた同時解析による識別精度について検討した。【試料および方法】試料は, 血痕試料 11 例を用いた。NGS・Miseq システムに用いる ABO 式血液遺伝子型判定用および mtDNA の全領域解析用のキャプチャプローブは, mtDNA の過剰増幅を避けるために, 核 DNA と mtDNA のプローブ比を 100:1 とした。また, 19 遺伝子のプローブは HaloPlex キットを使用した。DNA 試料の調整は SureSelect QXT Reagents キットのプロトコールに従って行った。遺伝子解析は NGS・Miseq を用い, 遺伝子型判定は解析ソフト SuerCall (アジレント) を用いた。本研究は日本大学歯学部倫理委員会で承認され, 開示すべき COI 関係にある企業・組織や団体などはない。【結果および考察】試料 11 例について, ABO 式血液遺伝子型, mtDNA 型および 19 遺伝子領域の SNP の同時解析はすべて可能であった。ABO 式血液遺伝子型判定では, 第 9 染色体の Coding 領域すべてを解析し得たことで, 型判定に必要なエクソン 6 および 7 以外領域にも変異を見つけることができた。また, mtDNA の全領域を解析し系統を調べたところ, 11 系統に分類された。遺伝性不整脈関連心疾患の 19 エクソン領域を検査に加えることにより, 変異プロファイルが多く検出され, 識別精度が向上したことから, 本法は個人識別の鑑定に充分応用できると思われた。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Simultaneous analysis of ABO blood genotype, mtDNA and HaloPlex hereditary arrhythmia-related heart trouble research panel using the SureSelect system

○Tsutsumi H^{1,2}, Maruyama S^{1,2}, Izawa H^{1,2}, Komuro T^{1,2}

¹Dept Leg Med, Nihon Univ Sch Dent

²Div Soc Dent, Dent Res Center, Nihon Univ Sch Dent

Introduction: We analyzed the SNP of ABO blood genotype and mitochondrial DNA with the NGS system using capture library kit SureSelectQXT. In addition, we also analyzed the HaloPlex hereditary arrhythmia-related heart trouble research panel (Human Panel:Ajilent). **Materials and Methods:** DNA was extracted from 11 blood stain samples. The capture probe used for NGS Miseq system was adjusted to 100:1 (nuclear DNA/ mtDNA ratio) in order to avoid the excessive amplification of mtDNA. The experimental procedure was followed the protocol of the SureSelect QXT Reagents kit. **Result and Discussion:** SNP analysis of ABO blood genotype, mtDNA and Human Panel were done simultaneously and successful for all 11 samples. By analyzing the entire sequences of the chromosome 9, we found the novel mutation sites other than Exon 6 and 7 which are satisfactory to determine the ABO genotype. Moreover, mtDNA analysis revealed that mtDNA could be classified into 11 systems. In addition to these results, numerous mutations were found in Human Panel. These results suggested that the NGS analysis used in this study is quite useful and can be applied to the personal identification.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-162 トロミ剤の添加が咀嚼行動および食品食塊物性に及ぼす影響

○塩澤 光一, 奥村 敏

鶴大 歯 生理

【目的】咀嚼行動および嚥下食塊物性に及ぼすトロミ剤の影響について検討した。【方法】実験は12名の成人被験者（男性5名，女性7名，平均28.6歳）で行った。トロミ剤（4 mL, 1% w/w）を加えた状態と加えない状態の2種の試験食品（米飯，ビスケット，各8g）を各被験者にそれぞれに嚥下まで自由に咀嚼させた。嚥下までの咀嚼回数は，被験者の咬筋から記録した筋電図記録を用いて計測した。試験食品や食塊の物性は傾斜計を用いて測定した。傾斜計の傾斜版（1度/秒で傾斜する）に載せた試料がスタートラインから動き出した時点の角度（SA）と25 mm先にあるラインに到達した時点の角度（AA）を求めた。【結果および考察】トロミ剤を加えると，嚥下までの咀嚼回数は，米飯，ビスケットどちらも有意（ $p < 0.05$ ）に減少した。しかしながら，嚥下直前の食塊のSAとAAを比較すると，米飯，ビスケット塊どちらも，トロミ剤を加えた食塊と加えない食塊で有意な差は認められなかった。以上の結果から，咀嚼する食品にトロミ剤を加えることで，安全に嚥下できる状態の食塊形成が促進され，その結果，嚥下までの咀嚼回数が減少したことが考えられる。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Effects of addition of thickening agent on masticatory behavior and physical properties of food bolus

○Shiozawa K, Okumura S

Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

To elucidate the effects of thickening agent (TA) on masticatory behavior and physical properties of bolus, number of chewing strokes until swallowing (NCS) and physical properties of bolus just before swallowing were examined. Twelve adult subjects (mean age 28.6 y) were instructed to chew 8 g of two test foods, cooked rice and biscuit, with and without TA (4 mL, 1% w/w). The NCS was counted from the masseteric EMG recordings. The properties of bolus were identified by the incline analysis. In this analysis, the sliding bar was inclined at an angular velocity of 1 degree / s. We measured the angle which the food or bolus began to slide down the bar (starting angle, SA) and then when it passed over the end line (25 mm apart from starting line, arrival angle, AA). Addition of TA significantly ($p < 0.05$) decreased the NCS for both foods. There were no significant differences in two angles (SA, AA) for both bolus with and without TA. These results strongly suggest that the presence of TA accelerate bolus formation for swallowing.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-163 魚類の耳石化石に観察される成長線に関する形態学及び分析学的研究○三島 弘幸¹, 近藤 康生², 見明 康雄³¹高知学園短大 医療衛生 歯科衛生²高知大 理³東歯大 組織発生

【目的】耳石の主成分は炭酸カルシウム (CaCO₃) の結晶からなる。魚類の耳石の組織には、同心円状の成長線が観察され、サーカディアンの日周期、潮汐周期、季節周期、年輪などの周期があると報告されている。しかし、耳石の成長線の微細構造、化学組成や周期性の形成機序について詳細な研究はあまり報告例がない。本研究では、魚類の耳石化石において、種による成長線の構造と組成変化、あるいは周期性の変化を検索することを目的とした。【方法】材料は高知県室戸市唐ノ浜層群登層産（鮮新世）の耳石化石である。魚類としては、生息環境の異なるソコダラ科ノボリダンゴヒゲ、ネズミヒゲ、ミサキソコダラ、カラフトソコダラの5種、ハダカイワシ科ハクトウハダカ、スイトウハダカの2種、フサカサゴ科ウケグチメバル、アナゴ科オキアナゴなどを用いた。試料は光学顕微鏡、偏光顕微鏡、デジタルマイクロコピー、SEMを用いて耳石の内部構造や成長線を観察し、成長線の周期を計測した。EPMAを用いて耳石の成分の定性分析と定量分析を行い、またX線回折法で耳石の結晶の解析を行った。【結果と考察】X線回折法による解析では耳石結晶は、アラゴナイトであった。耳石の内部は針状結晶からなっていた。針状結晶を横断する成長線が観察された。種により異なるが、サーカディアンの日周期2-5 μm、更に長周期の数種の成長線が観察された。約14日周期、約28日周期、季節周期に相当すると判断された。SEM像では成長線は暗帯として観察され、周囲の組織よりCaの含有量が少なく、微量元素としてSiを含有する例が多かった。中深層に生息するハダカイワシ科は大陸棚から斜面に生息するソコダラ科に比較し、サーカディアン成長線が不明瞭であった。生態系により成長線の形成周期が異なる可能性が示唆された。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Morphology and analytical studies on the incremental lines which are observed in the otolith fossils of fishes○Mishima H¹, Kondo Y², Miake Y³¹Dent Hygiene C, Dept Med Hygiene, Kochi Gakuen Coll²Fac Sci, Kochi Univ³Dept Histol Dev Biol, Tokyo Dent Coll

Little information is available regarding the ultrastructure, chemical composition and the periodicity of incremental lines of otolith fossils of fishes. The purpose of the present study is to examine the structure and composition of incremental lines in the otolith fossils of fishes through the histological and analytics studies. In this experiment, the otolith fossils of fishes (Nobori formation, Pliocene, Muroto, Kochi) were used. The specimens were observed and analyzed using a light microscopy, a polarizing microscopy, a scanning electron microscopy (SEM), a Miniscopy, a SEM-EDS analysis, an electron-probe microanalyzer (EPMA) and a X-ray diffraction method. The otolith crystals were aragonite by X-ray diffraction method. The inside of the otolith was observed to consist of needle-like crystals crossed by incremental lines. The circadian incremental lines, and several long period of incremental lines were observed in the otolith. The incremental lines had little content of Ca and contained Si as a trace element. *Lobianchia gemellarii* which inhabits the mesopelagic zone was unclear in the circadian incremental lines as compared with *Cetonus nobonesis* which inhabits a slope from a continental shelf. A possibility that the period of the incremental line of otolith changed with ecosystems was suggested.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-164 下顎臼歯および下顎骨の形成における塩分の役割

○乾 千珠子¹, 上田 甲寅², 中塚美智子², 松田 哲史², 隈部 俊二², 脇坂 聡¹

¹阪大 院歯 口腔解剖 1

²大歯大 口腔解剖

【目的】 歯や顎骨の形成には脂質やタンパク質が必須である。またミネラルも必要と考えられているが、その役割については不明である。そこで本研究では、胎生・乳仔期または離乳後の動物を低塩飼料で飼養することで、塩分が臼歯や下顎骨の形成に及ぼす影響を形態学的に調べた。【方法】 Wistar 系雌ラットの妊娠初日から出産後仔ラットの授乳期まで低塩飼料を呈示した (n=2)。一方、別の 2 匹には妊娠開始から通常飼料を呈示した。各母ラットから生まれた雄性仔ラットをさらに 2 群に分け、3 週齢で離乳させた後に母ラットと同じ飼料を呈示 (通常-通常群 (n=4)、低塩-低塩群 (n=6))、または母ラットと異なる飼料を呈示 (通常-低塩群 (n=4)、低塩-通常群 (n=6)) した。9 週齢で灌流固定により臼歯と下顎骨を採取し、各部の長さについて群間で比較した。【結果】 9 週齢時点での低塩-低塩群の体重は他の 3 群より有意に少なかった。低塩-低塩群の切歯から下顎骨尾側突出部までの長さは他群と比較して短かった。また、第三臼歯の近遠心径が有意に小さかった。一方、下顎頭の側方方向幅径については、低塩-低塩群のほうが通常-通常群や低塩-通常群より有意に長かった。第一、第二臼歯の近遠心径、および第一、第二、第三臼歯の頬舌径については群間で差はみられなかった。【考察】 母ラットの妊娠開始時点から低塩飼料を与えることで、胎生期から塩分が制限された状態においた。その結果、体重、下顎骨吻尾側方向の長さおよび第三臼歯近遠心径に異常が認められた。したがって、塩分の不足は全身性の発育や臼歯および下顎骨の形成に影響を及ぼすと考えられる。塩分制限は下顎頭の側方方向幅径の延長をもたらしたことから、単純な発育不全をもたらすわけではないと考えられ、顎骨形成における塩分の多様な役割が示唆される。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

The role of sodium in the formation of mandibular molars and bone

○Inui-Yamamoto C¹, Ueda K², Nakatsuka M², Matsuda Y², Kumabe S², Wakisaka S¹

¹Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent

²Dept Oral Anat, Osaka Dent Univ

Minerals are important for the formation of tooth and jaw. But it is unknown whether sodium consumption is related to their formation or not. Therefore, we investigated the effects of sodium deficiency on the development of mandibular molars and bone. Sodium-deficient Wistar rats were created by feeding with the low (0.03%) sodium diet during the fetal and lactation stages (pre-stage), and from weaning to 9 weeks-old (post-stage) (LOS-LOS, n=6). Another series of sodium deficient animals were fed with the normal (0.2%) diet on the post-stage (LOS-CON, n=6). Age-matched control animals were fed with the normal or the low sodium diet on the post-stage (CON-CON, n=4; CON-LOS, n=4). We observed that body weight of the LOS-LOS rats was significantly smaller. The LOS-LOS rats had significant shorter length of lower jaw and mesio-distal diameter of third molar, and longer bucco-lingual diameter of mandibular condyle. The lower body weights in the LOS-LOS rats indicate that sodium is required for normal growth. It was also found that sodium deficiency causes abnormal developments of tooth and jaw rather than hypoplasia of them. Thus, we conclude that sodium is pivotal in the formation of tooth and jaw.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-165 ヒストンメチル化酵素 G9a は腱組織の正常な発生に必要である

○和田 悟史¹, 出野 尚², 島田 明美², 上運天太一¹, 中村 芳樹¹, 中島 和久²,
木村 宏³, 眞貝 洋一⁴, 立花 誠⁵, 二藤 彰²

¹鶴大 歯 矯正

²鶴大 歯 薬理

³東工大 院 生命理工

⁴理研 細胞記憶研究

⁵徳大 疾患酵素学研究所

我々は以前、マウスの初代培養腱細胞を用いた実験でヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) メチル化酵素である G9a を欠損させると腱細胞の分化と増殖が抑制される事を報告した。そこで、生体での腱組織形成における G9a の機能を明らかにするために、Sox9-Cre マウスと G9a flox/flox マウスの交配から G9a conditional ノックアウト (cKO) マウスを作出した。まず発生において Sox9 陽性細胞由来の腱細胞が存在することを確認するために、Sox9-Cre;Rosa26-LacZ マウスの腱組織を解析した。LacZ の局在が腱細胞に存在し、腱細胞が Sox9 陽性細胞由来であることを確認した。cKO での G9a 発現抑制を確認するために、腱組織における G9a の発現を免疫組織化学にて行ったところ G9a cKO マウスではコントロールマウスと比較して著しく減少し、G9a の基質である H3K9me2 のタンパクレベルも G9a cKO マウスの腱組織で減少していることを確認した。生後 3 週齢の G9a cKO マウスは Sox9-Cre;G9a flox/+ マウスに比べ腱組織の形成不全を示した。また胎生 16.5 日齢の HE 染色において、G9a cKO マウスの腱組織の形成不全が認められた。Collagen I の免疫染色ではコントロールマウスに比べて G9a cKO マウスの腱組織で発現の減少が認められた。また BrdU ラベリングでは G9a cKO マウスで BrdU 陽性細胞数の減少が認められ、コントロールと比較して増殖能が低下していることを確認した。TUNEL 染色では Sox9-Cre;G9a flox/+ マウスと G9a cKO マウスに変化は見られなかった。これらの結果より、G9a が *in vivo* においても腱組織の発生過程で正常な増殖と分化において必須である可能性が示唆された。

【利益相反】 利益相反状態にはありません。

Histone methyltransferase G9a is required for proper tendon formation

○Wada S¹, Ideno H², Shimada A², Kamiunten T¹, Nakamura Y¹, Nakashima K², Kimura H³,
Shinkai Y⁴, Tachibana M⁵, Nifuji A²

¹Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med

²Dept Pharmacol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

³Sch and Grad Sch Biosci and Biotechnol, Tokyo Inst of Technol

⁴Cellular Memory Laboratory, RIKEN

⁵Inst of Enzyme Res, Tokushima Univ

We previously reported that cell differentiation and proliferation were suppressed in G9a-null tenocytes *in vitro*. In this study, we examined the function of G9a *in vivo* during tendon development by using G9a conditional KO (cKO) mice. To generate the cKO mice, we crossed G9a flox/flox mice with Sox9-Cre mice. To address whether Sox9 positive cells contribute to tenocytes, we observed localization of LacZ positive cells in Sox9-Cre;Rosa26-LacZ mice and confirmed many LacZ positive cells in tendon tissue. Immunohistochemical analyses revealed that protein level of G9a and H3K9me2, the G9a substrate, were decreased in tendon tissue in G9a cKO mice. Tendons were hypoplastic in G9a cKO mice compared with control mice at E16.5 and 3 weeks of age. Collagen I protein was expressed at lower level in tendon tissue in G9a cKO mice at E17.5. BrdU labeling revealed that numbers of BrdU labeled cells were decreased in tendon tissue in G9a cKO mice at E16.5. These results suggest that G9a plays essential roles in growth and differentiation in developing tendons.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-166 様々な細胞に対するセラミクスナノ粒子の細胞刺激性の検討

○成徳 英理¹, 阿部 薫明²¹北大 院歯 保存²北大 院歯 生体材料

近年のナノテクノロジーの発展により、ナノマテリアルは様々な分野で注目されている。これらナノマテリアルはそのサイズに依存して特徴的な性質を示すため、電気・電子材料、光学材料から医療分野まで多岐にわたる研究がなされている。特に様々な応用展開が期待されるナノカーボン物質や無機ナノ粒子は、多くの研究者の興味を集めている。また一方で、これらナノマテリアルはその生体適合性/ナノ毒性の観点からの検討も為されている。マクロレベルでは生体適合性を示す物質であっても、粒子サイズがナノレベルに達すると毒性を発現する物もある。それ故、ナノ粒子の生体適合性へのナノサイズ効果が多くの研究者の興味を集めている。これまでも無機ナノ粒子について、その粒子サイズや形状に依存した細胞刺激性の発現が報告されている。また、亘理らはTiやTiO₂といった生体適合材料であっても、そのサイズの低下により生体への刺激性を示す事を報告している。本研究ではセラミクスナノ粒子の細胞適合性を評価する為に、TiO₂, SiO₂, In₂O₃, Fe₂O₃, CuOなどのセラミクスナノ粒子をHeLa, 骨芽細胞, 上皮細胞などへと曝露し、その応答を検討した。また蛍光性粒子を用いることで、細胞への取り込みの有無を確認した。一部粒子(Fe₂O₃, CuO)では粒子サイズの違いにより、細胞活性の低下・増殖率の低下など、細胞応答の変化が確認されたが、粒子間の細胞刺激性の比較から、細胞への影響はその化学種の違いによる効果が支配的であることが示された。また、一部粒子の細胞への取り込みが確認されたが、それらの粒子においても、有意な細胞刺激性は見られなかった。

【利益相反】利益相反状態にはありません。

Cytocompatibility of nano-sized ceramics particles on several cells

○Seitoku E¹, Abe S²¹Dept Restor Dent, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med²Dept Biomater Bioengin, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Because of recent development of nanotechnology, nano-sized materials have received much attention both university and industrial fields. Though nano-sized materials show unique properties depending on their size, these nanoparticles have been widely investigated. In particular, carbon nanomaterials and inorganic nanoparticles have been widely investigated because of their potential for many applications. On the other hand, nano-sized materials have also attracted considerable attention because of their possible biocompatibility and/or nanotoxicity. When particles reach nano-level, some of them exhibit toxicity *in vitro* even if they are considered biocompatible at the macro level. Thus, many researchers were interested a nano-size effect on their biocompatibility. When particles reach nano-level, some of them exhibit toxicity *in vitro* even if they are considered biocompatible at the macro level. Watari et al. suggested that even biocompatible materials such as Ti and TiO₂ cause inflammation as their particle size decreases. In this study, we investigated the cytocompatibility of ceramics nanoparticles (TiO₂, SiO₂, In₂O₃, Fe₂O₃, CuO etc.) for several cells such as HeLa, osteoblast cells and epithelial cells.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

P2-167 加齢に伴う生体リズムの減弱○高須 奈々^{1,2}, 草野慎之介^{1,3}, 中西祐一郎^{1,3}, 中村 渉¹¹阪大 院歯 口腔時間生物²日本学術振興会 (RPD)³阪大 歯

体内時計の重要な機能として、生殖機能の制御がある。雌性生殖機能は加齢と共に減退し、閉経を迎えるまでの移行期には性周期の不整や消失を伴う。体内時計もまた加齢から逃れることはできず、middle-aged 期には概日リズム中枢である視床下部視交叉上核の神経出力の低下が認められる(文献1, 2)。時計遺伝子 *Cry* KO マウスは、自由継続周期に変調をきたし *Cry1* KO は概日周期の短縮を、*Cry2* KO は概日周期の延長を呈するが、24 時間周期の明暗サイクルに同調し、野生型と同等の繁殖が可能である。我々は、*Cry* KO 雌性マウスが、本来、妊娠・出産可能な8~12ヶ月齢期に早期性周期不整を伴う不妊を呈することをみいだした。また、同月齢期に規則的な性周期をしめす野生型雌性マウスを、1週間毎に環境明暗サイクルをシフトする“社会的時差ボケ”環境下におくことで、規則的だった性周期は消失した。“社会的時差ボケ”サイクルは、性成熟期野生型雌性マウスの性周期を乱すことはなかった。Middle-aged *Cry1, 2* KO マウスに生じる性周期不整と早期不妊は、環境明暗サイクルをマウス遺伝型固有の周期に調整することで劇的に改善された(文献3)。以上の結果は、サーカディアンペースメーカーの環境リズムと生理機能タイミングとの調和をはかることの重要性をしめしている。また、生殖機能の早期減退が概日リズム機能の加齢変調によって生じるリスクをしめすと共に、環境の最適化により早期不妊症を回避できる「サーカディアン戦略」を示唆している。

1. Nakamura et al. (2011) J Neurosci. 31, 10201-10205.

2. Nakamura et al. (2015) eNeuro. 0064-15.2015.

3. Takasu et al. (2015) Cell Rep. 12, 1407-1413.

【利益相反】 利益相反状態にはありません。**Age-related decline in biological rhythms**○Takasu N^{1,2}, Kusano S^{1,3}, Nakanishi Y^{1,3}, Nakamura W¹¹Lab Oral Chronobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent²JSPS (RPD)³Dept Dent, Osaka Univ

Female reproductive function changes during aging with the estrous cycle becoming more irregular during the transition to menopause. We found that intermittent shifts of the light-dark cycle disrupted regularity of estrous cycles in middle-aged female mice, whose estrous cycles were regular under unperturbed 24-h light-dark cycles. Although female mice deficient in *Cry1* or *Cry2*, the core components of the molecular circadian clock, in which the shortening (22.5 h, for *Cry1*KO) or lengthening (24.5 h, for *Cry2*KO) of genotype-specific circadian periods are known, exhibited regular estrous cycles during young, they showed accelerated senescence characterized by irregular and unstable estrous cycles and resultant infertility in middle age. Notably, tuning the period length of the environmental light-dark cycles closely to the endogenous one inherent in the *Cry*-deficient females restored the regularity of the estrous cycles and consequently improved fertility even in middle age. These results suggest that age-related changes in early onset estrous cycle irregularities and resultant infertility are strongly dependent on biological clock functioning. Desynchronization between the environment and the biological clock (i.e., "circadian timing shift") has a major impact on female reproductive functions. Furthermore, normal reproductive functioning can be rescued by manipulation of environmental timing signals.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

The 58th Annual Meeting of
Japanese Association for Oral Biology
August 24 – August 26, 2016
Health Sciences University of Hokkaido
School of Dentistry, JAPAN



JAOB JAPANESE ASSOCIATION FOR
ORAL BIOLOGY since 1958

Plenary Lecture Accorded by the LOTTE Foundation (Open Lecture for Citizenry)

(August 25, 13 : 00-14 : 00)

PL-1

Modeling human psychiatric/neurological disorders using iPS cell technologies and transgenic non-human primates

Hideyuki Okano

Dept Physiol, Keio Univ Sch Med

Special Symposium Accorded by the LOTTE Foundation: A new horizon for gene-targeting medical technologies (August 25, 14 : 10-16 : 10)

FS-1

The maturation of gene therapy: oral and general application on the horizon

Baum, Bruce J.

Natl Inst Dent Craniofac Res

FS-2

Development of therapeutic modality for fibrosis by use of VA-liposome HSP 47

Niitsu Y

Molecular Target Exploration Lab, Center for FMI, Hokkaido Univ

FS-3

Front-line of genetic engineering using genome editing technology

Sakuma T

Dept Math and Life Sci, Grad Sch Sci, Hiroshima Univ

Lecture by JAOB/Lion Dent Research Awards Winner (August 25, 11 : 10-12 : 00)

L-1

Exploration of functional regulators for branching morphogenesis of salivary gland epithelia by microanalysis of gene expression

Sakai T

Dept Oral-facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

JAOB/Rising Members Award Winner (August 26, 11 : 00-12 : 00)

Y-1

Involvement of circadian clock in bone metabolism

Hirai T

Dept Pharmacol, Sch Dent, Aichi-Gakuin Univ

Y-2

Mutant activin-like kinase 2 in fibrodysplasia ossificans progressiva are activated via T203 by BMP type II receptors

Fujimoto M^{1,2}, Ohte S¹, Osawa K¹, Miyamoto A¹, Tsukamoto S¹, Mizuta T¹, Kokabu S¹, Suda N², Katagiri T¹

¹Div Pathophysiol, Res Center for Genomic Med, Saitama Med Univ, ²Div Orthodont, Dept Human Dev Fostering, Meikai Univ Sch Dent

Y-3

Molecular mechanisms of sweet-suppressing effect by gymnemic acids on the sweet taste receptor, TAS1R2/TAS1R3

Sanematsu K¹, Shigemura N¹, Ninomiya Y²

¹Sect Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ, ²Div Sensory Physiol, Res Dev Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu Univ

Y-4

Attenuation of the PI3 kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp

Nakayama M^{1,2}

¹Dept Oral Microbiol, Grad Sch Med, Dent and Pharma Sci, Okayama Univ, ²Adv Res Center for Oral and Craniofac Sci, Dent Sch, Okayama Univ

Symposium of JAOB: Current status of basic research for tissue regeneration (August 25, 9 : 00-11 : 00)

KS-1

Epiprofin regulates dental epithelial stem cell fate to the ameloblast lineage and differentiation through its multiple functions

Yamada Y¹, Sakai K^{1,2}, Chiba Y^{1,5}, Mahboubi D¹, Ikeuchi T¹, Ishikawa M^{1,3}, Nakamura T^{1,4}, Fukumoto S^{1,5}

¹Lab Cell Dev Biol, NIDCR, NIH, ²Dept Oral Maxillofac Surg, Nagoya Univ Grad Sch Med, ³Dept Restorative Dent, Div Oper Dent, Tohoku Univ, Grad Sch Dent, ⁴Div Mol Pharmacol Cell Biophysics, Dept Oral Biol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ⁵Div Pediatr Dent, Dept Oral Health Dev Sc, Tohoku Univ Grad Sch Dent

KS-2

Laminin active peptides conjugated matrices as a biomaterial for tissue engineering

Nomizu M, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y

Dept Clin Biochem, Tokyo Univ Pharmacy Life Sci

KS-3

Senescence changes the extracellular matrix environment in adult neurogenesis

Arikawa-Hirasawa E, Kerever A, Yamada T

Res Inst for Dis of Old Age, Grad Sch Med, Juntendo Univ

KS-4

Regenerative approach of salivary gland targeting stem cells

Sakai T

Dept Oral-facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

KS-5

SCF ^{β -TRCP} E3 ubiquitin ligase promotes lipid synthesis in an mTORC-dependent manner

Inuzuka H¹, Fukushima H¹, Shimizu K², Wei W², Fukumoto S¹

¹Center for Adv Stem Cell and Regenerative Res, Tohoku Univ, ²Beth Israel Deaconess Med Center, Boston, MA

Symposium of Science Council of Japan (August 26, 9 : 00-11 : 00)

CS-1

Signal transduction between oral biology and clinical dental research

Yamaguchi A

Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll

CS-2

Periodontal tissue regeneration with BDNF (brain-derived neurotrophic factor)

Kurihara H

Dept Periodont Med, Div Appl Life Sci, Inst Biomed Health Sci, Hiroshima Univ
CS-3

Costimulation Research – from bench to bedside and back to bench–

Azuma M

Tokyo Med Dent Univ, Grad Sch Med Dent Sci; Member, Science Council of Japan

CS-4

Future directions of clinical treatment of orofacial pain disorders: Any hope for feedback from basic research?

Yatani H

Dept Fixed Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

CS-5

Orofacial pain its underlying mechanism and clinical relevance

Iwata K

Dept Physiol, Sch Dent, Nihon Univ

Main Symposium A (August 25, 9 : 00–11 : 00)

MSA-1

In vivo imaging analyses for monitoring the intracellular signaling with biological functions: monitoring of Ca²⁺ responses in salivary acinar cells with salivary secretions and blood flow

Tanimura A, Nezu A, Morita T

Div Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

MSA-2

In vitro analysis of homeostatic mechanism of bone using two-photon microscopy

Hikita A

Dept Cartilage & Bone Regeneration, Grad Sch Med, The Univ Tokyo

MSA-3

Functional analyses of bone cells by integrative approaches of multimodal super resolution microscopy

Iimura T^{1~4}, Lee J-W²

¹Ehime Univ, Proteo-Science Center (PROS), ²Ehime Univ, Advanced Research Support Center (ADRES), ³Ehime Univ, Grad Sch Med, ⁴Ehime Univ Hosp, Artificial Joint Integrated Center

MSA-4

Electron microscopy of tissues, cells and molecules in hydrophilic environment

Sato C¹, Ebihara T¹, Okuda K², Kawata M³, Sato M¹, Yamazawa T⁴, Mizunoe Y², Sugimoto S²

¹Biomed-sps AIST, ²Dept Bacteriol, The Jikei Univ Sch Med, ³Cd-fmat AIST, ⁴Dept Mol Physiol, The Jikei Univ Sch Med

Main Symposium B (August 25, 15 : 00–17 : 00)

MSB-1

Oral microecosystem —Listen to the silent majority—

Takahashi N

Div Oral Ecol Biochem, Dept Oral Biol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

MSB-2

Scardovia wiggsiae and its potential role as a caries pathogen

Kressirer C, Tanner A

The Forsyth Institute, Cambridge, MA, USA

MSB-3

The strategy for oral biofilm -The best use of oral *Veillonella*-

Mashima I^{1,2}, Theodorea CF², Miyakawa H², Nakazawa F²

¹Postdoctoral Fellow of JSPS, ²Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

MSB-4

Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity

Ramage G

Oral Sci Res Group, Glasgow Dent Sch, Sch Med, Dent Nursing, Univ Glasgow, UK

Main Symposium C (August 26, 9 : 00-11 : 00)

MSC-1

Structure and function of maturation stage ameloblasts: An overview

Takano Y

Tokyo Med Dent Univ (Emeritus)

MSC-2

The role of KLK4 and maturation-stage ameloblasts

Yamakoshi Y¹, Kobayashi-Kinoshita S²

¹Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ, ²Dept Pediatr Dent, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

MSC-3

Expression and function of TRP channel involved in enamel mineralization

Okabe K¹, Ogata K^{1,2}, Shin M¹, Oka K², Okamoto F¹, Kajiya H¹

¹Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll, ²Pediatr Dent, Fukuoka Dent Coll

MSC-4

Function of V-ATPase for highly calcification during enamel maturation

Harada H¹, Ida-Yonemochi H², Sahara Y³, Ohshima H², Fujiwara N¹, Otsu K¹

¹Dept Anat, Iwate Med Univ, ²Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch, ³Dept Physiol, Iwate Med Univ

MSC-5

Role of glucose metabolism in cell differentiation of maturation stage ameloblasts

Ida-Yonemochi H

Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Main Symposium D (August 26, 13 : 10-15 : 10)

MSD-1

Studies on molecular mechanisms underlying dementia induced by periodontal disease and masticatory dysfunction in mice

Michikawa M

Dept Biochem, Nagoya City Univ Sch Med Sci

MSD-2

Modulation of higher brain function in association with food characteristics during growth period

Ono T

Orthodont Sci, Tokyo Med Dent Univ

MSD-3

Activating and inhibitory system in the peripheral-central neuronal networks of orofacial sensation

Kuramoto E, Iwai H, Yamanaka A, Goto T

Dept Oral Anat Cell Biol, Grad Sch Med Dent Sci, Kagoshima Univ

MSD-4

How human brains activate by tastes in the mouths? : From brain mapping to the network

Goto T

Dept Oral Maxillofac Radiol, Tokyo Dent Coll

Lunchon Seminar (August 25, 12 : 00-12 : 50)

LS-1

Multi-modal applications of light microscopy for morphological and functional analyses of hard-tissue —
From DIC (differential interference contrast) to innovative fluorescence microcopies—

Iimura T^{1~4}, Lee J-W²

¹Ehime Univ, Proteo-Science Center (PROS), ²Ehime Univ, Advanced Research Support Center (ADRES), ³Ehime Univ, Grad Sch Med, ⁴Ehime Univ Hosp, Artificial Joint Integrated Center

LS-2

Author workshop for young researchers supported by Elsevier: How to make a scientific paper including publishing ethics and image processing

Ohshima H^{1,2}

¹Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, ²EIC of J Oral Biosci

LS-3-1

New insights into the taste reception (umami and salty)

Shigemura N^{1,2}

¹Sect Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ, ²Res Dev Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu Univ

LS-3-2

Importance of umami taste sensitivity maintenance on elderly's health with dentistry

Satoh-Kuriwada S, Shoji N, Sasano T

Div Oral Diagnosis, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Satellite Symposium 1 (August 24, 12 : 30-14 : 10)

SS1-1

How much has implant dentistry satisfied patients?

Furusawa T¹, Kuboki Y²

¹Grad Sch Sci Engin, Yamagata Univ/ Furusawa Dental Clinic, ²Fac Earth Environ Sci, Hokkaido Univ

SS1-2

New solution to oral implant for gingival integration

Yagami K¹, Sadaoka S¹, Kuboki Y², Furusawa T³, Ametani A⁴

¹Dept Stomatol for Health Promotion, Grad Sch, Matsumoto Dent Univ, ²Fac Earth Environ Sci, Hokkaido Univ, ³Grad Sch Sci Engin, Yamagata Univ, ⁴HI-LEX Corp

SS1-3

Application of CNTs to the surface treatment of titanium

Yokoyama A

Dept Oral Funct Prosthodont Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

SS1-4

The efficacy and limitation of hydroxyapatite coated implants

Ochi M, Nakanishi Y, Hirose Y

Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent Div Fixed Prosthodont Oral Implantol

SS1-5

Fusion of dentin materials and bone inductive surgery for bone regeneration

Murata M¹, Akazawa T²

¹Oral and Maxillofac Surg, Health Sci Univ Hokkaido, ²Industrial Technology Research, Hokkaido Research Organization

SS1-6

Application of autologous platelet rich plasma (PRP) for hard and soft tissues reconstruction around the dental implants

Okudera H

Tokyo Dental Plastic Society

SS1-7

Elucidation of the mechanism for the titanium-fixation in living bone: discovery of the implant proteins and its clinical application

Kuboki Y¹, Furusawa T², Yagami K³

¹Fac Earth Environ Sci, Hokkaido Univ, ²Grad Sch Sci Engin Yamagata Univ, ³Dept Social Dent Matsumoto Dent Univ

Satellite Symposium 2 (August 24, 12 : 30-14 : 10)

SS2-1

Three-dimensional ultrastructural analysis on hard tissue interface

Hirashima S^{1,2}, Ohta K¹, Kanazawa T¹, Togo A^{1,3}, Okayama S¹, Kusakawa J², Nakamura K¹

¹Dept Anat, Kurume Univ Sch Med, ²Dent Oral Med Center, Kurume Univ Sch Med

³EM Lab, Cent Res Unit of Kurume Univ Sch Med, ⁴CMRIBD, Kurume Univ Sch Med

SS2-2

3-dimensional evaluation of dentinal caries using FIB/SEM tomography

Miura J¹, Shimizu M¹, Enomoto S², Arai S²

¹Div Interdisci Dent Osaka Univ Grad Sch Dent, ²Inst Mater Systems for Sustainability, Nagoya Univ

SS2-3

The osteocyte network formation is influenced by the collagen-bundle formation

Hashimoto M¹, Nagaoka N², Iimura T³, Oshima Y³, Hara T⁴, Kamioka H¹

¹Dept Orthodont Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, ²ARCOCS Okayama Univ Sch Dent

³Div Bio Imaging PROS Ehime Univ, ⁴NIMS

SS2-4

3D observation of the titanium implant and bone tissue interface

Nagaoka N¹, Yoshihara K², Maruo Y³

¹ARCOCS, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, ²Center Innov Clinic Med, Okayama Univ Hosp, ³Dept Occlusal Oral Funct Rehabil, Okayama Univ Hosp

SS2-5

Morphological observation of bone formation around titanium implants using FIB-SEM in type 2 diabetic rats

Kawamoto S¹, Hashiguchi C², Sonomura T³, Nishimura M¹

¹Dept Oral Maxillofac Prosthodont, Grad Sch Med Dent Sci, Kagoshima Univ, ²Dept Periodontol, Grad Sch Med Dent Sci, Kagoshima Univ, ³Anat II, Kanazawa Med Univ

Satellite Symposium 3 (August 24, 12 : 30-14 : 10)

SS3-1

Overview (New concept for receptor-mediated signaling)

Tanimura A

Div Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

SS3-2

New strategy for acetylcholinesterase inhibitors in bone regenerative medicine

Sato T, Yoda T

Dept Oral Maxillofac Surg, Fac Med, Saitama Med Univ

SS3-3

$\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor: a promising therapeutic target for osteoporosis

Saeki M¹, Egusa H²

¹Niigata Univ Grad Sch Med Dent, Sci Div Dent Pharmacol, ²Tohoku Univ Grad Sch Dent, Div Mol Regen Prosthodont

SS3-4

Neuropsychopharmacology of muscarinic acetylcholine receptors

Takuma K^{1,2}, Hasebe S¹, Nakazawa T^{1,3}, Hashimoto H^{2,3}, Matsuda T⁴, Ago Y³

¹Dept Pharmacol, Osaka Univ Grad Sch Dent, ²Osaka Univ United Grad Sch Child Dev, ³Lab Mol Neuropharmacol, Osaka Univ Grad Sch Pharm Sci, ⁴Lab Med Pharmacol, Osaka Univ Grad Sch Pharm Sci

SS3-5

Involvement of serotonin and serotonin receptors in the migraine pathophysiology

Cui Y

Mol Dynamics Imaging Unit, RIKEN Center for Life Sci Technol

SS3-6

Cholinergic regulation of medium spiny neuron activity in the rat nucleus accumbens

Kobayashi M

Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent

Satellite Symposium 4 (August 24, 12 : 30-14 : 10)

SS4-1

Involvement of neuron-glia interaction in the trigeminal ganglion in neuropathic pain

Kaji K^{1,2}, Shinoda M¹, Shimizu N², Iwata K¹

¹Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent, ²Dept Orthodont, Nihon Univ Sch Dent

SS4-2

Role of proteinases in dental enamel development

Shin M^{1,2}, Okamoto F¹, Kajiya H¹, Ogata K¹, Okabe K¹

¹Div Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll, ²Div Biosci, Ohio State Univ

SS4-3

Live cell fluorescence imaging for the prevention of oral diseases

Nishide S, Fujioka Y, Horiuchi K, Horiguchi M, Satoh A, Nepal P, Wang J, Nanbo A, Ohba Y

Dept Cell Physiol, Hokkaido Univ Grad Sch Med

Satellite Symposium 5 (August 24, 12 : 30-14 : 10)

SS5-1

Distribution of blood vessels and nerves at palate by the three-dimensional positional observation

Miwa Y

Dept Anat, Nippon Dent Univ

SS5-2

Microvascular architecture of the palatine mucosa

Toda I

Dept Anat, Osaka Dent Univ

SS5-3

Vascular structure and function of palatal microcirculation

Matsuo M¹, Takahashi SS², Hamada N³

¹Div Dent Anat, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, ²Div Circulation Control Dent, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, ³Div Microbiol, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

SS5-4

Lymphatic architecture of *Suncus murinus* (House Musk shrew) palatum

Ando Y¹, Hatakeyama S², Fujimura A¹

¹Div Func Mor, Dept Anat, Iwate Med Univ Sch Dent, ²Div Orthodont, Dept Dev Oral Health Sci, Iwate Med Univ Sch Dent

Satellite Symposium 6 (August 24, 12 : 30-14 : 10)

SS6-1

Evaluation of temporal alteration of orthodontic pain

Adachi K¹, Suda N², Sakagami H¹

¹Meikai Univ Sch Dent, Div Pharmacol, ²Meikai Univ Sch Dent, Div Orthod

SS6-2

Spatiotemporal properties of cortical excitation induced by periodontal stimulation in the model with experimental tooth movement

Kobayashi M

Dept Pharm, Nihon Univ Sch Dent

SS6-3

Oral pain and TRPV1 channel

Kido M^{1,2}, Yoshizumi J³, Takao T², Yoshimoto R⁴, Ohyama Y³, Aijima R¹, Takaoka Y⁵, Toyofuku A⁶

¹Sect Anat Physiol, Saga Med Sch, ²Mol Cell Biol Oral Anat, Grad Sch Dent, Kyushu Univ, ³Sect Oral Maxillofacial Surg, Kyushu Univ, ⁴Sect Periodont, Grad Sch Dent, Kyushu Univ, ⁵Dev Med Infomatics Bioinformatics, Kobe Univ, ⁶Psychosomatic Dent, Grad Sch Tokyo Med Dent Univ

Satellite Symposium 7 (August 24, 14 : 20-16 : 00)

SS7-1

Type IX secretion system and gliding motility in Bacteroidetes phylum bacteria

Nakayama K

Div Microbiol Oral Infect, Dept Mol Microbiol Immunol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

SS7-2

The role of *Porphyromonas gingivalis* hydrogen sulfide in mouse inflammation

Shioya K

Dept Oral Microbiol, Matsumoto Dent Univ

SS7-3

Epidemiology and transmission of *Porphyromonas gulae* among dogs and owners

Sasaki H, Watanabe K, Hamada N

Div Microbiol, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ

SS7-4

Structural and mechanistic insights into a distinct type of pilus

Shoji M¹, Xu Q², Shibata S¹, Naito M¹, Sato K¹, Wilson IA³, Nakayama K¹

¹Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, Dept Microbiol Oral Infect, ²Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, SLAC National Accelerator Laboratory, USA, ³The Scripps Research Institute, USA

SS7-5

Osteoimmunology in periodontal disease

Tsukasaki M¹, Komatsu N¹, Nakashima T², Takayanagi H¹

¹Dept Immunol, Grad Sch Med Fac Med, The Univ Tokyo, ²Dept Cell Signal, Grad Sch Med Dent Sci, Tokyo Med Dent Univ

Satellite Symposium 8 (August 24, 14 : 20-16 : 00)

SS8-1

Molecular basis of redox regulation for reactive persulfides

Akaike T

Dept Environ Health Sci Mol Toxicol, Tohoku Univ Grad Sch Med

SS8-2

Redox cross talk regulation between Nrf2 and eIF2 α -ATF4 pathway

Itoh K

Dept Stress Response Sci, Hirosaki Univ Grad Sch Med

SS8-3

Redox biology and dental disease -Periodontitis as vascular disease by alteration of redox balance-

Lee M

Yokosuka · Shonan · Disaster Health Emerg Res Center, Kanagawa Dent Univ

SS8-4

8-Nitro-cGMP is a novel bone expansion factor

Miyamoto Y

Dept Biochem, Showa Univ Sch Dent

Satellite Symposium 9 (August 24, 14 : 20-16 : 00)

SS9-1

The novel mechanism underlying Alzheimer's disease-like neuropathology and cognitive deficits following *Porphyromonas gingivalis* periodontal infection

Wu Z^{1,2}, Nakanishi H¹

¹Sect Aging Sci Pharmacol, ²OBT Res Center, Kyushu Univ Grad Sch Dent

SS9-2

The oscillation in the insular cortex implicated in taste-dependent feeding behavior

Toyoda H¹, Sato H¹, Saito M², Kang Y¹

¹Dept Neurosci Oral Physiol, Osaka Univ Grad Sch Dent, ²Dept Oral Physiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

SS9-3

Modulation of taste sensitivity by orexigenic and anorexigenic factors: Effect of obesity

Yoshida R^{1,2}

¹Sect Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ, ²OBT Res Center, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

SS9-4

Peripheral neural mechanisms underlying ectopic orofacial pain

Shinoda M, Kaji K, Honda K, Sugiyama T, Iwata K
Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

Satellite Symposium 10 (August 24, 14 : 20-16 : 00)

SS10-1

Analysis of in vivo bone marrow mesenchymal stem cells by fate mapping approach

Mizoguchi T

Inst for Oral Sci, Matsumoto Dent Univ

SS10-2

Regulation of developmental switching of salivary gland between “morphogenesis” and “differentiation”
Matsumoto S¹, Kurimoto T², Fujii S³, Kikuchi A¹

¹Dept of Mol Biol Biochem, Osaka Univ Grad Sch Med, ²1st Dept OMFS, Osaka Univ Grad Sch Dent,

³Sect Oral Pathol, Kyushu Univ Grad Sch Dent

SS10-3

Activated PDGFR α signaling in pericytes switches the cell fate

Iwayama T^{1,2}, Wakisaka S¹, Murakami S²

¹Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent, ²Dept Periodontol, Osaka Univ Grad Sch Dent

SS10-4

Unveiling novel regulatory mechanisms of osteoclasts by combinatorial approaches of functional live-imaging and molecular omics

Lee J-W¹, Iimura T^{1,2}

¹Ehime Univ, PROS, Div Bio-Imaging, ²Ehime Univ, Adv Res Support Center (ADRES)

SS10-5

The altered phenotype of tumor endothelial cells in tumor microenvironment

Hida K, Maishi N

Vascular Biol, Frontier Res Unit, Inst for Genetic Med, Hokkaido Univ

Satellite Symposium 11 (August 24, 14 : 20-16 : 00)

SS11-1

Experience of personal identification of unidentified bodies using dental findings in the Great East Japan Earthquake 2011

Ohbayashi Y, Miyake M

Dept Oral Maxillofac Surg, Fac Med, Kagawa Univ

SS11-2

Repeated problems of personal identification using dental findings in past disasters

Sakuma A, Saitoh H, Iwase H

Dept Legal Med, Grad Sch Med, Chiba Univ

SS11-3

Why we need to become a specialist in forensic dentistry

Katsumura S¹, Sato K^{1,2}

¹Dept Forensic Med Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ²Inst for Res Educ Preemptive Med, Tsurumi Univ

SS11-4

Disaster victim identification by dental records : Response of dental society

Sasaki K¹, Aoki T², Suzuki T³, Satoh M⁴

¹Tohoku Univ Grad Sch Dent, Div Adv Prosthet Dent, ²Tohoku Univ Grad Sch Information Sci, ³Tohoku Univ Grad Sch Dent, Div Dent Digital Forensics, ⁴Miyagi Pref Dent Assoc

Satellite Symposium 12 (August 24, 14 : 20-16 : 00)

SS12-1

SCADA is Unique! 22 years history of the JDA / DENTSPLY Student Clinician Research Program

Okumura T¹, Ishida Y²

¹Dept Human-Comp Interface Design, Shizuoka Inst Sci Technol, ²Div Dent Edu Res Dev, Niigata Univ
Grad Sch Med Dent Sci

SS12-2

Show the Sprit of Scientist !!! ~ What we found from SCRPP~

Kobayashi R

Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

SS12-3

Let's participate in SCRPP! ~ SCADA and oral biology~

Kusuyama J

Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Satellite Symposium 13 (August 24, 16 : 10-17 : 50)

SS13-1

Salivary glands: a unique and valuable system for oral biology and all biomedical science

Baum BJ

Scientist Emeritus, Natl Inst Dent Craniofac Res

SS13-2

RNA interactions between tissues in fetal mouse salivary glands

Hayashi T^{1,2,3}, Kashimata M², Hoffman MP³

¹Dept Anat, Kitasato Univ Sch, Allied Health Sci, ²Dept Dent Pharmacol, Asahi Univ Sch Dent, ³NIH,
NIDCR

SS13-3

The Rho GTPase Cdc42 is required for maintenance of submandibular gland lumen

Shitara A, Weigert R

NCI, NIH

SS13-4

Physiological analysis of mouse salivary gland fluid secretion

Kondo Y¹, Nakamoto T², Mukaibo T¹, Munemasa T¹, Kusuda Y¹, Miyagi Y¹, Tsuka S¹, Masaki C¹,
Hosokawa R¹

¹Div Oral Reconstr Rehabil, Kyushu Dent Univ, ²Dept Prosthodont, Sch Dent, Matsumoto Dent Univ

SS13-5

Tissue-autonomous development of the circadian rhythm in salivary glands

Uchida H

Dept Pathol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

Satellite Symposium 14 (August 24, 16 : 10-17 : 50)

SS14-1

The paradigm shift in taste research ~Identification and application of taste stem cells~

Iwatsuki K

Tokyo Univ Agric, Dept Nutr Sci Food Safety

SS14-2

Molecular mechanisms for the sweet-inducing effect of miraculin

Sanematsu K¹, Yoshida R^{1,2}, Shigemura N¹, Ninomiya Y³

¹Sect Oral Neurosci, Grad Sch Dent, Kyushu Univ, ²OBT Res Centr, Kyushu Univ, ³R&D TAOS, Kyushu Univ

SS14-3

Reduction of neurogenesis and olfactory function by impaired mastication and its recovery

Kashiwayanagi M, Utsugi T

Dept Sensory Physiol, Asahikawa Med Univ

SS14-4

The intracortical integration mechanism for information of odor and taste

Mizoguchi N¹, Kobayashi M², Muramoto K¹

¹Div Physiol, Dept Human Dev Foster, Meikai Univ Sch Dent, ²Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent

SS14-5

Evaluation of the masking of dimethyl sulfide odors by food derived volatiles through the use of trained odor sensor mice

Osada K

Div Physiol, Dept Oral Biol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Satellite Symposium 15 (August 24, 16 : 10-17 : 50)

SS15-1

From understanding mechanisms of swallowing to treatment strategy of dysphagia

Inoue M, Tsujimura T, Magara J, Tsuji K

Div Dysphagia Rehabil, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

SS15-2

Effects of histamine and serotonin on mesencephalic trigeminal neurons and jaw-closing motoneurons

Inoue T, Nakamura S, Nakayama K, Mochiduki A, Kiyomoto M

Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent

SS15-3

By what neuronal pathways do emotions affect mastication?

Yoshida A, Sato F, Kato T

Dept Oral Anat Neurobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

SS15-4

The pain pathway in the trigeminal nerve system, and the descending pain control by the cerebral motor cortex

Goto T, Kuramoto E, Iwai H

Dept Oral Anat Cell Biol, Grad Sch Med Dent Sci, Kagoshima Univ

SS15-5

Glial cell involvement in extraterritorial pain associated with trigeminal nerve injury

Iwata K, Shinoda M, Katagiri A

Dept Physiol, Sch Dent, Nihon Univ

Satellite Symposium 16 (August 24, 16 : 10-17 : 50)

SS16-1

The importance and difficulty of the periodontal treatment

Mitani A, Kikuchi T

Dept Periodontol, Sch Dent, Aichi-Gakuin Univ

SS16-2

Challenge for the novel therapeutics of periodontal regeneration

Ogata Y

Dept Periodontol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

SS16-3

Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cell

Takedachi M¹, Sawada K¹, Lee CM², Iwayama T¹, Yamamoto S¹, Morimoto C¹, Hirai A¹, Sano Y¹, Matsuyama A³, Okura H³, Kitamura M¹, Murakami S¹

¹Osaka Univ Grad Sch Dent, Dept Periodontol, ²Osaka Univ Grad Sch Med, Dept Med Innov, ³Natl Inst Biomed Innov, Health Nutr, Res on Dis Bioresources, Platform of Therapeut for Rare Dis

SS16-4

Challenge for development of regenerative medicinal products using autologous cells

Hata K

Japan Tissue Engineering Co., Ltd.

SS16-5

Importance of the platform system for the regenerative medicine popularization in dentistry

Tobita M

Dept Plast Reconstr Surg, Juntendo Univ Sch Med

■ Oral Presentation

(August 25, 9 : 00-9 : 30)

01-C1	Osteoprotegerin regulates the differentiation of Peyer's patch M cell ○Kimura S ¹ , Mutoh M ² , Iwanaga T ¹ (¹ Div Histo. & Cyto, Hokkaido Univ Grad Sch Med, ² Dept Orthodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
01-C2	CXCL4 is a novel nickel binding protein and augments nickel allergy ○Kuroishi T ¹ , Tanaka Y ^{1,2} , Endo Y ¹ , Sugawara S ¹ (¹ Div Oral Immunol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ² Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
01-C3	Identification and characterization of dendritic cells in murine salivary glands ○Lu L ^{1,2} , Tanaka Y ^{2,3} , Sugawara S ² (¹ Div Oral Diag, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ² Div Oral Immunol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ³ Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent)

(August 25, 9 : 30-10 : 00)

01-C4	Analyses of locally recruiting T cells in the oral mucosa inflammation ○Hirunwidchayarat W, Ohno T, Kang SW, Nagai S, Azuma M (Dept Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
01-C5	Role of PI3K in Tr1 cells differentiation ○Niken A, Azuma M, Nagai S (Div Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
01-C6	IL-12/IL-18 mediated activation of human V γ 9V δ 2 T cells ○Domae E ¹ , Goda S ² , Yoshikawa Y ¹ , Kamada A ¹ , Ikeo T ¹ (¹ Dept Biochem, Osaka Dent Univ, ² Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent)

(August 25, 10 : 00-10 : 30)

01-C7	The role of cathepsin S in Th17 cell differentiation by <i>Porphyromonas gingivalis</i> lipopolysaccharide ○Dekita M ^{1,2} , Wu Z ² , Nakanishi H ² , Takahashi I ¹ (¹ Sect Orthod Dentofac Orthop, Kyushu Univ Grad Sch, ² Sect Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ)
01-C8	Effects of bisphosphonate on M1-polarized THP-1 cells induced by lipopolysaccharides ○Kaneko J ^{1,2} , Hikiji H ² , Okinaga T ¹ , Ariyoshi W ¹ , Nishihara T ¹ (¹ Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ, ² Div Oral Maxillofac Surg, Kyushu Dent Univ, ³ Sch Oral Health Sci, Kyushu Dent Univ)
01-C9	Involvement of inflammasome in IL-1 α -inducing activity of <i>Streptococcus sanguinis</i> ○Saeki A ¹ , Hasebe A ¹ , Kamezaki R ¹ , Suzuki T ² , Shibata K ¹ (¹ Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Div Bacter Pathogenesis, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)

(August 25, 10 : 30-11 : 00)

01-C10	Comparative analysis of periodontal-pathogen <i>Treponema denticola</i> strains ○Nagano K, Hasegawa Y, Yoshida Y, Yoshimura F (Div Microbiol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent)
01-C11	Exploration of genes putatively involved in biofilm formation of <i>Prevotella intermedia</i> by a genome comparison between strains 17 and 17-2 ○Yamanaka T, Nambu T, Maruyama Y, Wang P, Mashimo C, Yamane K (Dept Bacteriol, Osaka Dent Univ)
01-C12	Metatranscriptomic analyses of microbiota in peri-implantitis and periodontitis lesions ○Watanabe T ¹ , Shiba T ² , Kachi H ³ , Takeuchi Y ² , Maruyama F ⁴ , Izumi Y ² , Nakagawa I ⁴ (¹ Lab Food-borne Pathog Microbiol, Res Center for Food Safety, Grad Sch Agri & Life Sci, The Univ of Tokyo, ² Sect Periodontol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ³ Sect Maxillofac Surg, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ⁴ Dept Microbiol, Kyoto Univ Grad Sch Med)

(August 25, 11 : 00-11 : 30)

01-C13	Salivary microbiome reflects the severity of periodontitis ○Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Yamashita Y (Sect Prev Dent Public Health, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
01-C14	Effects of persimmon tannin on regrowth of polymicrobial biofilms ○Tomiyama K ¹ , Ishizawa M ¹ , Watanabe K ² , Kawata A ³ , Saito M ⁴ , Takahashi O ³ , Hamada N ² , Exterkate R ⁵ , Mukai Y ¹ (¹ Dept Cariol Restorative Dent, Kanagawa Dent Univ, ² Dept Microbiol, Kanagawa Dent Univ, ³ Dept Neuroanat, Histol, Embryol, Kanagawa Dent Univ, ⁴ Div Operative Dent, Tohoku Univ, Grad Sch Dent, ⁵ Dept Preventive Dent, Academic Centre for Dent Amsterdam (ACTA), The Netherlands)
01-C15	Novel strategy for biofilm inhibition using small molecules targeting molecular chaperone DnaK ○Arita-Morioka K ¹ , Nagao J ² , Narita Y ² , Hashimoto M ² , Tasaki S ² , Ikezaki S ² , Cho T ² , Tanaka Y ² (¹ Adv Sci Res Cent, Fukuoka Dent Coll, ² Div Infect Biol, Fukuoka Dent Coll)

(August 25, 15 : 00-15 : 40)

01-C16	NF- κ B regulates the endochondral bone formation ○Nakatomi C ¹ , Kokabu S ¹ , Matsubara T ¹ , Nakatomi M ² , Urata M ¹ , Jimi E ¹ (¹ Div Mol Signal Biochem, Kyushu Dent Univ, ² Div Anat, Kyushu Dent Univ)
01-C17	Dgcr2 contributes to the chondrocytes differentiation by modulating TGF- β signaling ○Kajiwara K (Dept Mol Life Sci, Tokai Univ, Sch Med)

01-C18 The roles of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein in chondrocyte differentiation and proliferation
○Naito M, Kasahara M, Ohashi A, Takahashi T (Dept Anat, Nihon Univ Sch Dent)

01-C19 Expression of Syndecan family in the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible
○Fujikawa K, Takahashi M, Shibata S (Div Maxillofac Anat, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)

(August 25, 15 : 40-16 : 20)

01-C20 Analysis of transgenic mice overexpressing Fam20C in osteoblasts
○Hirose K¹, Sato S¹, Sharyo M¹, Noda Y¹, Komori T², Toyosawa S¹ (¹Dept Oral Pathol, Osaka Univ Grad Sch Dent, ²Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci)

01-C21 Micro/nano structural properties in peri-implant jaw bone of human cadaver
○Matsunaga S¹, Koresawa K^{1,2}, Odaka K^{1,2}, Hirouchi H¹, Morita S^{1,2}, Yamaguchi A², Abe S¹ (¹Dept Anat, Tokyo Dent Coll, ²HRC, Tokyo Dent Coll)

01-C22
(withdrawn)

01-C23 Basic and clinical reproduction by bone metabolism marker and self-blood-derived PRP derived substance
○Okudera H (Tokyo Plastic Dental Society)

(August 25, 16 : 20-16 : 40)

01-C24 Hyperpolarizing responses by Zn²⁺ in osteoblastic MC3T3-E1 cells
○Guang M, Yoshida T, Nakamura T, Wakamori M (Div Mol Pharmacol Cell Biophys, Dept Oral Biol, Tohoku Univ Grad Sch Dent)

01-C25 Analysis of TRP channels in human oral squamous cell carcinoma
○Aijima R^{1,2}, Yoshimoto R³, Cao AL^{1,4}, Mori K², Zhang JQ⁴, Ohsaki Y⁴, Danjo A², Yamashita Y², Kiyoshima T³, Kido M¹ (¹Div Histol & Neuroana, Fac Med, Saga Univ, ²Dept Oral & Maxillofac Surg, Fac Med, Saga Univ, ³Sect Oral Pathol, Grad Sch Dent, Kyushu Univ, ⁴Sect Mol Cell Biol & Oral Anat, Grad Sch Dent, Kyushu Univ)

(August 25, 9 : 00-9 : 40)

01-D1 Functions of uncarboxylated osteocalcin in cancer progression
○Hayashi Y^{1,4}, Kawakubo-Yasukochi T², Kuratani A^{1,3}, Nakamura S⁴, Hirata M¹ (¹Sect Mol Cell Biochem, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ²Dept Immunol Mol Pharmacol, Fukuoka Univ Pharm Sci, ³OBT Res Cent, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ⁴Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent)

01-D2 Arl4c expression and its involvement in tumorigenesis of colorectal cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma
○Fujii S¹, Matsumoto S² (¹Sect Oral Pathol, Kyushu Univ, Grad Sch Dent, ²Dept Mol Biol Biochem, Osaka Univ Grad Sch Med)

01-D3 β -TRCP-mediated FNIP2 degradation to control Birt-Hogg-Dube (BHD) complex and modulate mTORC activity involved in the onset of BHD syndrome
○Nagashima K^{1,2,3}, Fukushima H¹, Hoshikawa S¹, Watahiki A¹, Fukumoto S¹, Okabe K² (¹Cent Adv Stem Cell & Regen Res, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ²Div Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll, ³Div Oral Surg, Fukuoka Dent Coll)

01-D4 Minimal essential region required Kruppel-like factor 5 expression and the regulation by Sp3
○Mihara N (Dept Biochem, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)

(August 25, 9 : 40-10 : 10)

01-D5 Ubiquitin proteasome pathway regulates Borealin stability and its significance
○Tsunematsu T, Kudo Y, Yamada A, Arakaki R, Ishimaru N (Dept Oral Mol Pathol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci)

01-D6 Is chemokine CXCL14, a multi-step tumor suppressor, a differentiation regulator of squamous epithelial cells ?
○Ikoma T¹, Yang X^{2,3}, Ozawa S¹, Maehata Y², Hata R^{2,3} (¹Dept Oral Maxillofac Surg, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ, ²Dept Oral Sci, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ, ³Oral Health Sci Res Center, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ)

01-D7 Topographical mapping of premalignant epithelium on excised tongue mucosal lesions
○Soeno Y (Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)

(August 25, 10 : 10-10 : 50)

01-D8 Regulatory mechanisms for malignant properties by blood group antigen Lewis y in oral squamous cell carcinomas
○Hamamura K, Togari A (Dept Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent)

01-D9 Intercellular crosstalk defined by exosomes from oral squamous carcinoma cells determines its pathological process
○Morioka M^{1,2}, Kawakubo-Yasukochi T², Nakamura S¹ (¹Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ²Dept Immun Mol, Fukuoka Univ Fac Pham Sci)

01-D10 The relationship between Galectin-1 expression at the tumor invasion front and tumor metastasis of oral gingival squamous cell carcinoma
○Noda Y, Satou S, Hirose K, Sharyo M, Toyosawa S (Dept Oral Pathol, Osaka Univ Grad Sch Dent)

01-D11	Induction of NETosis-like cell death of gingival epithelial cells by butyrate stimulation promotes release of inflammation-related molecules ○Tsuda H, Murofushi T, Yamaguchi Y, Suzuki N (Dept Biochem, Nihon Univ Sch Dent)
---------------	--

(August 25, 10 : 50-11 : 30)

01-D12	MMP-20 regulates enamel development via cadherin/catenin signaling ○Shin M ¹ , Okamoto F ¹ , Kajiya H ¹ , Ogata K ¹ , Okabe K ¹ (¹ Div Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll, ² Div Biosci, Ohio State Univ)
01-D13	The semaphorin 4D-RhoA-Akt signal regulates amelogenin secretion in coordination with cell polarity during ameloblast differentiation ○Otsu K ¹ , Ida-Yonemochi H ² , Fujiwara N ¹ , Harada H ¹ (¹ Div Dev Bio Reg Med, Iwate Med Univ Sch Dent, ² Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci)
01-D14	Runx1 and Cbfb in dental enamel epithelium is important for enamel formation in mouse ○Sarper S ¹ , Miura J ² , Yamaguchi S ³ , Imasato S ³ , Morita C ¹ , Yamashiro T ¹ (¹ Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent, ² Div Interdisci Dent Osaka Univ Grad Sch Dent, ³ Dept Biomater Sci, Osaka Univ Grad Sch Dent)
01-D15	Molecular biological analyses of tooth enamel and scale ganoine in certain primitive fishes ○Ishiyama M ¹ , Mikami M ² , Nakatomi M ³ , Oka S ⁴ , Sato A ⁵ , Tabata M ⁶ , Sasagawa I ⁷ (¹ Dept Histol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent, Niigata, ² Dept Microbiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent, Niigata, ³ Div Anat, Kyushu Dent Univ, ⁴ Dept Biol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent, Niigata, ⁵ Dept Anat Histocytol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ⁶ Dept Biostruct Sci, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ⁷ Adv Res Cent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent)

(August 25, 15 : 00-15 : 40)

01-D16	The role of non-muscle myosin II during mouse incisor morphogenesis ○Yamanaka A ¹ , Hu J ² , Goto T ¹ , Klein O ² (¹ Dept Anat Oral Sci, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Program in Craniofac Biol, Univ California, SF)
01-D17	Hertwig's epithelial sheath cells join the extracellular matrix expression in periodontal ligament ○Oka K ¹ , Itaya S ¹ , Ogata K ¹ , Toda M ¹ , Fujiwara N ² , Ohtsu K ² , Tatsuoka M ¹ , Ozaki M ¹ , Harada H ² (¹ Div Pediatr Dent, Fukuoka Dent Coll, ² Div Dev Bio Reg Med Iwate Med Univ Sch Dent)
01-D18	Expression of Meis2 in mouse dental pulp cells/tissue and osteoblasts/bone ○Kawashima N ¹ , Saito M ² , Okiji T ¹ (¹ Dept Pulp Biol Endod, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Div Oper Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
01-D19	Transplantation of dental pulp cells for acute spinal cord injury in a rat model ○Otani K ^{1,2} , Sakuma S ³ , Honda M ² (¹ Adv Center for Tissue Engineering Ltd., ² Div Oral Anat Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, ³ Div Crown Bridge Aichi-Gakuin Univ Sch Dent)

(August 25, 15 : 40-16 : 10)

01-D20	Effect of aspirin on dentinogenesis of stem cells from apical papilla ○Tanaka Y, Yamaza T, Tomoda E, Sonoda S, Uehara N, Kyumoto Y, Kukita T (Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
01-D21	Nitric oxide accelerates dentinogenic capacity of rat dental pulp stem cells ○Sonoda S ^{1,2} , Yamaza T ¹ , Tomoda E ¹ , Tanaka Y ¹ , Kukita T ¹ (¹ Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Sect Periodontol, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
01-D22	YAP/TAZ signaling in 3D culture clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complex ○Komatsu N, Kajiya M, Fujita T, Kurihara H (Dept Periodontal Med, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci)

(August 25, 16 : 10-16 : 50)

01-D23	Analysis of deciduous teeth-derived stem cells from patients with cleft lip and palate ○Yamaza T ¹ , Yamaza H ² , Sonoda S ¹ , Tomoda E ^{1,2} , Tanaka Y ¹ , Uehara N ¹ , Kyumoto Y ¹ , Nonaka K ² , Kukita T ¹ (¹ Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Sect Pediatr Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
01-D24	Runx signaling is specifically involved in the fusion between the primary palate and the secondary palate by regulating Tgfb3 signaling ○Sarper S, Kurosaka H, Mihara K, Aoyama G, Yamashiro T (Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent)
01-D25	Retinoic acid affects craniofacial patterning by regulating sonic hedgehog signaling ○Wang Qi, Yamashiro T, Kurosaka H (Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent)
01-D26	Hand2 transforms upper jaw to lower jaw by regulating the expression of homeobox transcription factors ○Funato N (Res Center for Med and Dent Sci, Tokyo Med Dent Univ)

(August 26, 9 : 00-9 : 30)

02-C1	The role of Runx1 in the salivary gland morphogenesis ○Ono H ¹ , Sarper S ² , Yamashiro T ² , Sakai T ¹ (¹ Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent, ² Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent)
02-C2	Peroxidase activity of several types granules of pre- and postnatal rat sublingual glands by analyze electron microscopy ○Moriguchi K, Honda M (Div Oral Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent)

O2-C3	Characterization of dynamic features of basic proline rich lacrimal protein (BPLP) in human whole saliva ○Sega T ¹ , Imai A ² , Kato T ³ , Saitoh E ¹ (¹ Grad Sch Technol, Niigata Inst of Technol, ² Dept Dent Hygiene, The Nippon Dent Univ Coll at Niigata, ³ Dept Chem, Tokyo Dent Coll)
--------------	---

(August 26, 9 : 30-10 : 00)

O2-C4	Alpha 1-adrenoceptor agonist- and hypotonicity-induced trafficking of AQP5 in rat parotid acinar cells ○Bragiel A, Pieczonka T, Ishikawa Y (Dept Med Pharmacol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci)
O2-C5	Involvement of hemodynamics on acetylcholine-induced tissue-wide synchronization of Ca ²⁺ oscillations in rat submandibular gland ○Nezu A ¹ , Morita T ¹ , Ishii H ² , Tanimura A ¹ (¹ Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, ² Div Physiol, Health Sci Univ Hokkaido, Sch Dent)
O2-C6	The effectiveness of Pilocarpine for dry mouth patients -long-term medication for human and mouse - ○Ono H, Ikai K, Sakai T (Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent)

(August 26, 10 : 00-10 : 30)

O2-C7	Effects of melatonin on cartilage ○Hattori T, Nishida T, Kubota S (Dept Biochem Mol Dent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci)
O2-C8	Differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) is a novel negative regulator of hepatic fibroblast growth factor 21 (FGF21) in aging mice ○Bhawal U ¹ , Suzuki M ² , Fujita Y ² , Uchiyama T ³ , Arikawa K ⁴ , Shibutani K ² , Hiratsuka K ¹ (¹ Dept Biochem Mol Biol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, ² Dept Anesthesiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, ³ Dept Prev Public Oral Health, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, ⁴ Dept Social Dent (Medical Informatics), Nihon Univ Sch Dent at Matsudo)
O2-C9	The role of GLP-1 in osteocalcin-mediated regulation of whole body metabolism ○Mizokami A ^{1,2} , Kawakubo-Yasukochi T ³ , Takeuchi H ⁴ , Hirata M ² (¹ OBT Res Ctr, Kyushu Univ, ² Sect Mol Cell Biochem, Kyushu Univ, ³ Dept Immunol Mol Pharmacol, Fac Pharm Sci, Fukuoka Univ, ⁴ Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ)

(August 26, 10 : 30-11 : 00)

O2-C10	The elongation of vascular endothelial cells is induced by the inhibition of PI3K-Akt and mTORC1 signaling ○Tsuji-Tamura K, Tamura M (Dept Oral Biochem Mol Biol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
O2-C11	A putative mechanism of vasculogenesis estimated from morphological analysis of the chick embryo ○Hara Y ¹ , Inoue K ² , Sato T ¹ (¹ Dept Anat Histocytol Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Inst of Electron Microscopy, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
O2-C12	Anti-angiogenic activity of the extracellular matrix protein fibulin-7 and its C-terminal fragment <i>in vivo</i> ○Ikeuchi T ¹ , Forcinito P ¹ , de Vega S ² , Amaral J ³ , Rodriguez I ³ , Hirasawa E ² , Yamada Y ¹ (¹ Mol Biol Sect, Lab Cell and Dev Biol, NIDCR, NIH, ² Res Inst for Disease of Old Age, Juntendo Univ Grad Sch Med, ³ Lab Retinal Cell and Mol Biol NEI, NIH, Bethesda, MD, USA)

(August 26, 11 : 00-11 : 20)

O2-C13	Protective effects of hydrogen-rich water on free radical initiators-induced oxidative stress injuries in three-dimensional gingival tissue equivalents ○Xiao L ¹ , Miwa N ² (¹ Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, ² Prefec Univ of Hiroshima)
O2-C14	Bilirubin induces cell death of human deciduous teeth-derived stem cells ○Tomoda E ^{1,2} , Yamaza T ¹ , Yamaza H ² , Tanaka Y ¹ , Sonoda S ¹ , Nonaka K ² , Kukita T ¹ (¹ Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Sect Pediatr Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent)

(August 26, 13 : 10-13 : 40)

O2-C15	The cricothyroid joint in elderly Japanese individuals ○Abe S, Matsunaga S, Yamamoto M, Kitamura K (Dept Anat, Tokyo Dent Coll)
O2-C16	Gloss anatomical study on the human lingual vein ○Seki S ¹ , Sunohara M ¹ , Miwa Y ¹ , Baba O ² , Kitamura S ³ , Sato I ¹ (¹ Dept Anat, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, ² Dept Maxillofac Anat, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci, ³ Fac Health Sci, Morinomiya Univ of Med Sci)
O2-C17	Age-related of pulp chamber in maxillary premolar using micro-computed tomography ○Asami R ¹ , Aboshi H ² , Iwawaki A ¹ , Otaka Y ³ , Tanaka A ⁴ , Saka H ^{1,5} (¹ Div Forensic Odontol, Meikai Univ Sch Dent, ² Dept Leg Med, Nihon Univ Sch Dent, ³ Div Dent Radiol, Meikai Univ Sch Dent, ⁴ Tanaka Dental Clinic, ⁵ Forensic Odontol Center, Meikai Univ Sch Dent)

(August 26, 13 : 40-14 : 00)

O2-C18	Planning and carry out the program of the training seminar for dental identification at the mass disaster ○Yamada Y (Dept Disaster Relief Med/Dent Div Forensic Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent)
O2-C19	The study of protection of the portable intraoral X-ray unit ○Iwawaki A ¹ , Ootaka Y ² , Asami R ¹ , Tanaka A ³ , Saka H ^{1,4} (¹ Div Forensic Odontol, Dept Diagn Ther Sci, Meikai Univ Sch Dent, ² Div Dent Radiol, Dept Diagn Ther Sci, Meikai Univ Sch Dent, ³ Tanaka Dental Clinic, ⁴ Forensic Odontol Center, Meikai Univ Sch Dent)

(August 26, 14 : 00-14 : 40)

O2-C20	PfbA of <i>Streptococcus pneumoniae</i> contributes to the evasion from host innate immunity ○Yamaguchi M, Hirose Y, Goto K, Sumitomo T, Nakata M, Kawabata S (Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent)
O2-C21	<i>Streptococcus pyogenes</i> -produced endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q ○Ogawa M, Sumitomo T, Mori Y, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S (Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent)
O2-C22	Influenza A virus-induced surface display of GP96 promotes adherence of <i>Streptococcus pyogenes</i> to epithelial cells ○Sumitomo T, Nakata M, Mori Y, Ogawa M, Yamaguchi M, Kawabata S (Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent)
O2-C23	Evaluation of resistant mechanism of two-component system against nisin A in <i>Streptococcus pyogenes</i> ○Kawada-Matsuo M, Komatsuzawa H (Dept Oral Microbiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci)

(August 26, 14 : 40-15 : 10)

O2-C24	Two arginine residues of <i>Streptococcus gordonii</i> Hsa are associated with bacterial hemagglutination and aggregation of platelet ○Tashiro Y, Takahashi Y, Konishi K (Dept Microbiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
O2-C25	The distribution and frequency of oral <i>Veillonella</i> species in saliva from Thai children associated with oral hygiene status ○Theodora C ^{1,2} , Mashima I ^{1,3} , Nakazawa F ¹ (¹ Div Microbiol, Sch Dent Health Sci Univ Hokkaido, ² Dept Oral Biol, Fac Dent, Univ Indonesia, ³ Postdoc JSPS)
O2-C26	The sequence analysis of the novel <i>Veillonella</i> species isolated from tongue biofilm of Thai children ○Mashima I ^{1,2} , Theodora C ² , Nakazawa F ² (¹ Postdoc JSPS, ² Div Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido)

(August 26, 9 : 00-9 : 30)

O2-D1	Effect of local GDNF administration on functional recovery of facial sensation following inferior alveolar nerve transection ○Watanabe M ¹ , Shinoda M ² , Sugano N ¹ , Satou S ¹ , Iwata K ² (¹ Dept Periodontol, Nihon Univ Sch Dent, ² Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent)
O2-D2	The expression of cell adhesion molecules advancing inferior alveolar nerve regeneration ○Suzuki T ¹ , Kondo M ² , Sugano N ¹ , Iwata K ² , Sato S ¹ (¹ Dept Periodontol, Nihon Univ Sch Dent, ² Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent)
O2-D3	Odontoblast mechanical stimuli-induced action potential recording in rat TG neurons ○Sato M, Kimura M, Kojima Y, Higashikawa A, Shimada M, Ogura K, Mochizuki H, Kono K, Shibukawa Y, Tazaki M (Dept Physiol, Tokyo Dent Coll)

(August 26, 9 : 30-10 : 10)

O2-D4	Jaw opening-reflex modulation is adapted to the bite-raising during fictive mastication in rabbits ○Matsunaga T, Morita T, Hiraba K (Div Physiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent)
O2-D5	Electrophysiological properties of Phox2b-positive neurons situated in the reticular formation dorsal to the trigeminal motor nucleus in rats ○Nagoya K ^{1,2} , Nakamura S ² , Nakayama K ² , Mochizuki A ² , Kiyomoto M ² , Inoue T ² (¹ Div Oral Rehabil Med, Showa Univ Sch Dent, ² Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent)
O2-D6	Identification of rat supratrigeminal nucleus receiving inputs from masticatory muscle spindles ○Sato F, Kato T, Yoshida A (Dept Oral Anat Neurobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent)
O2-D7	PRIP regulates neuroinflammation-induced anorexia ○Yamawaki Y, Kanematsu T (Dept Cell Mol Pharmacol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci)

(August 26, 10 : 10-10 : 40)

O2-D8	Sequential changes in rat cortical responses to periodontal stimulation during experimental tooth movement ○Horinuki E ^{1,2} , Shimizu N ¹ , Koshikawa N ² , Kobayashi M ² (¹ Dept Orthodont, Nihon Univ Sch Dent, ² Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent)
O2-D9	The role of macrophages in ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury ○Batbold D ¹ , Shinoda M ¹ , Yamaguchi S ² , Iwata K ¹ (¹ Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent, ² Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
O2-D10	Extracellular ATP signaling through vesicular nucleotide transporter among neurons, satellite glia cells and microglia-like cells in the rat trigeminal ganglion ○Iwai H, Kuramoto E, Yamanaka A, Goto T (Dept Anat Oral Sci, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci)

(August 26, 10 : 40-11 : 20)

O2-D11	The regulatory mechanism of MyoD transcriptional activity by TLE3 ○Kokabu S, Nakatomi C, Matsubara T, Jimi E (Div Mol Signal Biochem, Dept Health Promotion, Kyushu Dent Univ)
O2-D12	Effects of LPS generated from <i>Porphyromonas gingivalis</i> on muscle mass in the whole body ○Kawamura N ¹ , Ohnuki Y ² , Okumura S ² , Gomi K ¹ , Ujicie Y ¹ , Umeki D ³ , Ito A ³ (¹ Dept Periodontol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ³ Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med)

O2-D13	Epac1-dependent hypertrophic effects of beta-2-adrenoceptor stimulation differ between slow- and fast-twitch muscles ○Ohnuki Y ¹ , Umeki D ² , Nariyama M ³ , Ito A ² , Kawamura N ⁴ , Yagisawa Y ² , Okumura S ¹ (1Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, 2Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med, 3Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med, 4Dept Periodontol, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
O2-D14	Role of β -adrenergic receptor subtype-specific signaling on masseter muscle ○Ito A ¹ , Ohnuki Y ² , Umeki D ¹ , Ishikawa M ³ , Kawamura N ⁴ , Yagisawa Y ¹ , Nakamura Y ¹ , Okumura S ² (1Dept Orthodont Tsurumi Univ Sch Dent Med, 2Dept Physiol Tsurumi Univ Sch Dent Med, 3Dept Oral Anat Tsurumi Univ Sch Dent Med, 4Dept Periodontol Tsurumi Univ Sch Dent Med)

(August 26, 13 : 10-13 : 50)

O2-D15	PP2A Ca is involved in osteoblast and adipocyte differentiation ○Okamura H ¹ , Yoshida K ^{1,2} , Teramachi J ² (1Dept Histol Oral Histol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci, 2Dept Oral Health Care Educ, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci)
O2-D16	A novel role of Epirofin in bone metabolism ○Nakamura T ¹ , Nakamura T ^{1,2} , Wakamori M ¹ , Fukumoto S ² (1Div Mol Pharmacol Cell Biophys, Tohoku Univ Grad Sch Dent, 2Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
O2-D17	Pannexin 3 and connexin 43 modulate skeletal development through their distinct functions and expression patterns ○Ishikawa M ¹ , Geneva W ² , Ikeuchi T ³ , Sakai K ³ , Fukumoto S ⁴ , Yamada Y ³ (1Div Oper Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent, 2Div Biol Biomed, Washington Univ in St. Louis, 3Lab Cell and Dev Biol, Natl Inst Dent Craniofac Res, Natl Inst of Health, 4Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
O2-D18	PKR regulates <i>Porphyromonas gingivalis</i> -induced NLRP3 expression through by NF- κ B pathway in osteoblasts ○Yoshida K ¹ , Okamura H ² (1Dept Oral Health Care Educ, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci, 2Dept Histol Oral Histol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci)

(August 26, 13 : 50-14 : 20)

O2-D19	BMP9 activates GSK3 β / β -catenin signaling in osteoblasts independently of Wnt ○Matsuguchi T ¹ , Eiraku N ² , Kusuyama J ¹ , Ohnishi T ¹ (1Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, 2Dept Periodontol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci)
O2-D20	Injection of RANKL-Binding peptide OP3-4 promotes BMP-2-induced maxilla augmentation in mice ○Uehara T ¹ , Tamura Y ² , Miyashin M ¹ , Aoki K ² (1Dept Pediatr Dent, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, 2Div Pharmacol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
O2-D21	JNK signaling regulates multifunctional differentiation of osteoblasts ○Kusuyama J, Ohnishi T, Matsuguchi T (Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci)

(August 26, 14 : 20-14 : 50)

O2-D22	Osteoclast forming potential of osteocyte-like cells derived from tamoxifen-induced CCN2 deficient mice ○Nishida T ¹ , Kubota S ^{1,2} , Takigawa M ² (1Dept Biochem Mol Dent Okayama Univ Grad Sch Med, Dent, Pharm Sci, 2Adv Res Ctr Oral Craniofac Sci, Okayama Univ Grad Sci Med Dent Pharm Sci)
O2-D23	PPP1r18 negatively regulates actin ring formation in osteoclasts ○Matsubara T ¹ , Nakatomi C ¹ , Kokabu S ¹ , Yamamoto T ² , Jimi E ¹ (1Div Mol Signal and Biochem, Kyushu Dent Univ, 2Div Orthod Dentofac Orthop, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
O2-D24	Wnt5a-Ror2 signaling regulates bone-resorbing activity of osteoclasts through Rho-Pkn3-c-Src pathways ○Uehara S ¹ , Yamashita T ² , Udagawa N ¹ , Takahashi N ² , Kobayashi Y ² (1Dept Oral Biochem, Matsumoto Dent Univ, 2Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ)

(August 26, 14 : 50-15 : 10)

O2-D25	Are osteoclasts induced in the presence of inflammatory cytokines related to the pathologically activated osteoclasts ? ○Shiratori T ^{1,3} , Kukita A ² , Uehara N ¹ , Kumamoto Y ¹ , Zhang JQ ¹ , Yamaza T ¹ , Koyano K ³ , Kukita T ¹ (1Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent, 2Sect Microbiol, Fac Med Saga Univ, 3Sect Implant Rehabil Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
O2-D26	Regulation of the expression of MafB, an osteoclastogenesis inhibitor, by galectin-9 ○Kumamoto Y ¹ , Uehara N ¹ , Kukita A ² , Yamaza T ¹ , Kukita T ¹ (1Sect Mol Cell Biol & Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sci Dent, 2Sect Microbiol, Fac Med, Saga Univ)

■ Poster Presentation

(August 25, 17 : 00-18 : 00)

P1-1	The role of Runx1 in the salivary gland morphogenesis ○Ono H ¹ , Sarper S ² , Yamashiro T ² , Sakai T ¹ (¹ Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent, ² Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent)
P1-2	Acquisition of the attachment pattern of the lateral pterygoid muscle insertion in embryonic mice ○Nagakura R, Kitamura K, Yamamoto M, Matsunaga S, Abe S (Dept Anat, Tokyo Dent Coll)
P1-3	Immunohistochemistry of Tcf4 expression during muscle regeneration ○Ogawa Y, Odaka K, Yamamoto M, Matsunaga S, Abe S (Dept Anat, Tokyo Dent Coll)
P1-4	Temperature change affects oral epithelial cells via TRPV4 channel ○Yoshimoto R ^{1,2} , Aijima R ⁴ , Ohsaki Y ³ , Cao A ³ , Zhang J ³ , Kiyoshima T ² , Kido M ⁴ (¹ Sect Periodontol, Kyushu Univ, Grad Sch Dent, ² Sect Oral Pathol, Kyushu Univ, Grad Sch Dent, ³ Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ, Grad Sch Dent, ⁴ Dept Anat Physiol, Saga Med Sch)
P1-5	Expression of TRPC in the rat trigeminal ganglion ○Fujita M ¹ , Sato T ² , Yajima T ² , Ichikawa H ² (¹ Div Dent Anesthesiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ² Div Oral and Craniofac Anat, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
P1-6	Regulation of the expression of MafB, an osteoclastogenesis inhibitor, by galectin-9 ○Kyumoto Y ¹ , Uehara N ¹ , Kukita A ² , Yamaza T ¹ , Kukita T ¹ (¹ Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Sect Microbiol, Fac Med, Saga Univ)
P1-7	RANKL induces microfold cells in tracheobronchial epithelium of the mouse ○Mutoh M ¹ , Kimura S ² , Yoshizawa S ¹ , Iwanaga T ² , Iida J ¹ (¹ Dept Orthodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Lab Histo Cyto, Hokkaido Univ Grad Sch Med)
P1-8	Morphology and distribution of myoepithelial cell of the rat in von Ebner's glands ○Taira F ^{1,2} , Kawabe Y ^{1,3} , Bando Y ¹ , Sakiyama K ¹ , Amano O ¹ (¹ Div Anat, Meikai Univ Sch Dent, ² Div Oral Surg 2, Meikai Univ Sch Dent, ³ Div Oral Rehabil, Meikai Univ Sch Dent)
P1-9	Localization of adiponectin and its receptors in sublingual glands of rats ○Miyake G ^{1,2} , Taira F ^{1,2} , Bando Y ¹ , Sakiyama K ¹ , Amano O ¹ (¹ Div Anat, Meikai Univ Sch Dent, ² Div Oral Surg 2, Meikai Univ Sch Dent)
P1-10	Expression of CGRP during development of mouse masseter muscle ○Azuma Y, Miwa Y, Sato I (Dept Anat, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P1-11	Characterization of dynamic features of basic proline rich lacrimal protein (BPLP) in human whole saliva ○Sega T ¹ , Imai A ² , Kato T ² , Saitoh E ¹ (¹ Grad Sch Technol, Niigata Inst of Technol, ² Dept Dent Hygiene, Nippon Dent Univ Coll at Niigata, ³ Dept Chem, Tokyo Dent Coll)
P1-12	Enhancement of immunosuppressive effects of mesenchymal cells (10T1/2) by humoral transmission of mouse oral squamous cell carcinoma cells (Sq1979) ○Ito H ¹ , Kamiya M ^{2,3} , Sumi S ^{1,2} , Kawaki H ² , Takayama E ² , Umemura N ² , Inagaki Y ^{2,4} , Muramatsu Y ¹ , Sumitomo S ¹ , Kondoh N ² (¹ Dept Oral Maxillofac Surg, Asahi Univ Sch Dent, ² Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, ³ Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin, ⁴ Dept Anesthesiol, Asahi Univ Sch Dent)
P1-13	BMP-2 reciprocally regulates TGF-β1-induced epithelial mesenchymal transition in human oral squamous cell carcinoma cell HSC-4 ○Chiba T ¹ , Kyakumoto S ² , Ishisaki A ² , Kamo M ² (¹ Div Oral Maxillofac Reg, Iwate Med Univ Sch Dent, ² Dept Biochem, Iwate Med Univ Sch Dent)
P1-14	Evaluation of properties of the hydrophilic titanium disks stored under various conditions after VUV irradiated ○Shintani K ^{1,2} , Kawaki H ² , Ishigure H ^{1,2} , Tatsumi Y ^{1,2} , Umemura N ² , Kamiya M ³ , Takayama E ² , Hotta M ¹ , Doi Y ⁴ , Kondoh N ² (¹ Dept Oper Dent, Asahi Univ Sch Dent, ² Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, ³ Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin, ⁴ Asahi Univ Sch Dent)
P1-15	Effects of the anesthetics on the immune response in the microenvironment of tumor tissue ○Inagaki Y ^{1,2} , Kamiya M ^{2,3} , Umemura N ² , Kawaki H ² , Takayama E ² , Sumi S ^{2,4} , Ito H ^{2,4} , Sakurai S ¹ , Chihara E ¹ , Kondoh N ² (¹ Dept Anesthesiol, Asahi Univ Sch Dent, ² Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, ³ Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin, ⁴ Dept Oral Maxillofac Surg, Asahi Univ Sch Dent)
P1-16	Evaluation of autoclave sterilized dentin particles / stem cell hybrid materials as a bone substitute ○Okuno K ^{1,2} , Kawaki H ² , Tanaka M ¹ , Takitani Y ¹ , Kawano S ¹ , Umemura N ² , Takayama E ² , Kamiya M ^{2,3} , Yoshida T ¹ , Kondoh N ² (¹ Dept Endodont, Asahi Univ Sch Dent, ² Dept Oral Biochem Asahi Univ Sch Dent, ³ Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin)
P1-17	Minimal essential region required Kruppel-like factor 5 expression and the regulation by Sp3 ○Mihara N (Dept Biochem, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P1-18	Evaluation of eluted ion properties from the surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) fillers ○Tatsumi Y ^{1,2} , Kawaki H ² , Ishigure H ^{1,2} , Shintani K ^{1,2} , Umemura N ² , Kamiya M ³ , Takayama E ² , Hotta M ¹ , Kondoh N ² (¹ Dept Oper Dent, Asahi Univ Sch Dent, ² Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, ³ Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin)
P1-19	Functions of uncarboxylated osteocalcin in cancer progression ○Hayashi Y ^{1,4} , Kawakubo-Yasukochi T ² , Kuratani A ^{1,3} , Nakamura S ⁴ , Hirata M ¹ (¹ Sect Mol Cell Biochem, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Dept Immunol Mol Pharmacol, Fukuoka Univ Pharm Sci, ³ OBT Res Cent, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ⁴ Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent)

P1-20	JNK signaling regulates multifunctional differentiation of osteoblasts ○Kusuyama J, Ohnishi T, Matsuguchi T (Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-21	An inquest of myeloid derived suppressor cells in primary tumor and metastasis tumor of oral squamous cell carcinoma ○Sumi S ¹ , Umemura N ² , Takayama E ² , Ito H ¹ , Kamiya M ³ , Kawaki H ² , Kondoh N ² , Sumitomo S ¹ (¹ Dept Oral Maxillofac Surg, Asahi Univ Sch Dent, ² Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, ³ Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin)
P1-22	TPD52 expression is post-transcriptionally regulated by TIA-1 and TIAR via mRNA stability ○Motohashi H, Mukudai Y (Dept Oral Surg, Showa Univ Sch Dent)
P1-23	Anti-angiogenic activity of the extracellular matrix protein fibulin-7 and its C-terminal fragment <i>in vivo</i> ○Ikeuchi T ¹ , Forcinito P ¹ , de Vega S ² , Amaral J ³ , Rodrigez I ³ , Hirasawa E ² , Yamada Y ¹ (¹ Mol Biol Sect, Lab Cell and Dev Biol, NIDCR, NIH, ² Res Inst for Disease of Old Age, Juntendo Univ Grad Sch Med, ³ Lab Retinal Cell and Mol Biol NEI, NIH, Bethesda, MD, USA)
P1-24	Effects of carbonate apatite on the osteoclastic differentiation as a bone substitute ○Takahashi J ¹ , Kawaki H ² , Kondo Y ¹ , Umemura N ² , Kamiya M ³ , Takayama E ² , Tanabe T ¹ , Doi Y ⁴ , Nagahara K ¹ , Kondoh N ² (¹ Dept Oral Implantol, Asahi Univ Sch Dent, ² Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, ³ Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin, ⁴ Dept Dent Mater Sci, Asahi Univ Sch Dent)
P1-25	Inhibition of neuropeptide Y Y1 receptor induces osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells ○Yahara M ¹ , Tsuji-Tamura K ² , Tamura M ² (¹ Dept Oral Maxillofac Dent, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Dept Oral Biochem Mol Biol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P1-26	Estimation of the glucose/amino acid metabolism of cancer cells using a metabolism-monitoring system and effects of environmental pH on the metabolism ○Morishima H ^{1,2} , Washio J ¹ , Kitamura J ^{1,2} , Takahashi T ² , Takahashi N ¹ (¹ Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ² Div Oral Maxillofac Surg, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
P1-27	Effects of the surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) filler eluate on the human dentin pulp stem-cell (hDPSC) activities ○Ishigure H ^{1,2} , Kawaki H ² , Tatsumi Y ^{1,2} , Shintani K ^{1,2} , Umemura N ² , Kamiya M ³ , Takayama E ² , Hotta M ¹ , Kondoh N ² (¹ Dept Oper Dent, Asahi Univ Sch Dent, ² Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, ³ Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin)
P1-28	Detection of oral bacteria-derived volatile metabolites from long term used removable denture ○Tagaino T ¹ , Suenaga H ² , Washio J ³ , Sasaki K ¹ , Takahashi N ³ (¹ Div Adv Prosthet Dent, ² Div Prevent Dent, ³ Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
P1-29	TGF- β Isoforms in porcine immature and mature enamel ○Okubo M ¹ , Kobayashi S ² , Yamamoto R ³ , Saito M ³ , Nagano T ¹ , Gomi K ¹ , Oida S ³ , Yamakoshi Y ³ (¹ Dept Periodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ³ Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P1-30	Interaction of TGF- β 1 and enamel proteins in porcine enamel ○Kobayashi S ¹ , Yamamoto R ² , Oida S ² , Asada Y ¹ , Yamakoshi Y ² (¹ Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P1-31	Effect of Er:YAG laser irradiation for porcine pulp tissues ○Yamakawa S ¹ , Niwa T ² , Kobayashi K ³ , Yamamoto R ⁴ , Hosoya N ^{1,4} , Yamakoshi Y ⁴ (¹ Dept Endodont, Tsurumi Univ, Sch Dent Med, ² Dent Perio, Tsurumi Univ, Sch Dent Med, ³ Dept Dent Hyg, Tsurumi Jr Coll, ⁴ Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P1-32	Action of TGF- β in root-surrounding tissues of deciduous teeth ○Shimazaki E ¹ , Karakida T ² , Yamamoto R ² , Asada Y ¹ , Yamakoshi Y ² (¹ Dept Pediatr, Tsurumi Univ, Sch Dent Med, ² Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P1-33	Ameloblastin and enamelin regulate osteoclastogenesis by modifying RANKL expression via p38 and Erk1/2 MAPKs signalling pathways ○Chaweewannakorn W ^{1,2} , Maki K ² , Ariyoshi W ¹ , Okinaga T ¹ , Nishihara T ¹ (¹ Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ, ² Div Pediatr Dent, Kyushu Dent Univ)
P1-34	Degradation of extracellular matrix by chondrocytes after exposure to interleukin-1 β in an NADPH oxidase-dependent manner ○Funato S ^{1,2} , Yasuhara R ³ , Miyamoto Y ¹ , Yoshimura K ¹ , Mishima K ³ , Baba K ² , Kamijo R ¹ (¹ Dept Biochem, Showa Univ Sch Dent, ² Dept Prosthodont, Showa Univ Sch Dent, ³ Dept Oral Diagnostic Sci, Div Pathol, Showa Univ Sch Dent)
P1-35	A RANKL-binding peptide W9 inhibits human osteoclast differentiation and stimulates human osteoblast differentiation ○Nakamura M ^{1,2} , Koide M ² , Yamashita T ² , Kobayashi Y ² , Takahashi N ² , Udagawa N ^{1,2} (¹ Dept Oral Biochem, Matsumoto Dent Univ, ² Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ)
P1-36	Bone augmentation around a dental implant using demineralized bone sheet containing biologically active substances ○Shirai M ¹ , Yamamoto R ² , Komatsu K ³ , Shimoda S ⁴ , Yamakoshi Y ² , Oida S ² (¹ Dept Removable Prosthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ³ Dept Pharmacol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ⁴ Dept Oral Anat, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P1-37	Inhibitory effects of sodium dichloroacetate and 2-deoxy-D-glucose on the glucose metabolism of oral squamous cell carcinoma ○Kitamura J ^{1,2} , Washio J ¹ , Morishima H ^{1,2} , Takahashi T ² , Takahashi N ¹ (¹ Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ² Div Oral Maxillofac Surg, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
P1-38	Induction of HIF1a in human dental pulp cells by lipopolysaccharide ○Fujii M, Kawashima N, Okiji T (Dept Pulp Biol Endod, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-39	Analysis of the transcription factor while mouse iPS cells were differentiated into the neural crest cells ○Sato A ¹ , Shino H ² , Onodera S ² , Saito A ² , Ichinohe T ¹ , Azuma T ² (¹ Dept Dent Anesthesiol, Tokyo Dent Coll Grad Sch Dent, ² Dept Biochem, Tokyo Dent Coll)
P1-40	The role of lysophospholipid acyltransferases in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells ○Tabe S ^{1,2} , Hikiji H ³ , Ariyoshi W ¹ , Okinaga T ¹ , Nishihara T ¹ (¹ Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ, ² Div Oral Maxillofac Surg, Kyushu Dent Univ, ³ Dept Oral Health Manage, Kyushu Dent Univ)

P1-41	Role of PI3K in Tr1 cells differentiation ○Niken A, Azuma M, Nagai S (Div Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-42	Cariogenicity of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in dental cavity is promoted by biofilm acidification via extracellular electron transfer ○Divya N ¹ , Okamoto A ² (Dept Advanced Interdisciplinary Studies, The Univ of Tokyo, Grad Sch Engin, ² Natl Inst of Mater and Sci (NIMS))
P1-43	Involvement of the TGF- β family in tooth development in adult mice ○Machiya A ^{1,2} , Jimi E ³ , Suda N ² , Katagiri T ¹ (Div Pathophysiol, Res, Center for Genomic Medicine, Saitama Med Univ, ² Div Orthod, Meikai Univ Sch Dent, ³ Div Mol Signal Biochem, Kyushu Dent Univ)
P1-44	Cdc42 is critical for cartilage development through PTH-mediated signaling ○Nagahama R ^{1,2} , Yamada A ¹ , Maki K ² , Kamijo R ¹ (Dept Biochem, Showa Univ Sch Dent, ² Dept Orthodont, Showa Univ Sch Dent)
P1-45	Reduced mastication impairs mandibular growth and memory ○Fukushima Y ^{1,2} , Ono T ¹ , Ono T ² , Nakashima T ^{3,4} (Div Cell Signal, Tokyo Med Dent Univ, Grad Sch Med Dent Sci, ² Div Ortho Sci, Oral health Sci, Tokyo Med Dent Univ, Grad Sch Med Dent Sci, ³ Precursory Res for Embryonic Sci Technol (PRESTO), Japan Science and Technology Agency (JST), ⁴ Japan Agency for Medical Research and Development, Core Research for Evolutional Science and Technology (AMED-CREST))
P1-46	MMP-20 regulates enamel development via cadherin/catenin signaling ○Shin M ¹ , Okamoto F ¹ , Kajiya H ¹ , Ogata K ¹ , Okabe K ¹ (Div Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll, ² Div Biosci, Ohio State Univ)
P1-47	Development of a novel gingival blood flow measurement technique: Age-related changes in gingival microcirculation in humans ○Ohsugi Y, Nagashima Y, Nakatsu S, Sato K, Chiba A, Fujinaka H, Yano Y, Niki Y (Personal Health Care Products Res, Kao Corp.)
P1-48	Measurements of baropressure in the pharynx during swallowing in the healthy subjects ○Hasegawa M ^{1,2} , Okamoto K ¹ , Kurose M ¹ , Yamada Y ² , Fujii N ² , Yamamura K ¹ (Div Oral Physiol, Niigata Univ Grad Med Dent Sci, ² General Dent Clinic Edu Unit, Niigata Univ Med Dent Hosp, ³ Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll)
P1-49	Satellite cell involvement in ectopic tooth-pulp pain associated with acute pulpitis ○Komiya H ¹ , Shinoda M ² , Iwata K ² , Ogiso B ¹ (Dept Endodont, Nihon Univ Sch Dent, ² Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent)
P1-50	Alkali sensitive store-operated Ca ²⁺ entry (SOCE) in rat odontoblasts ○Kimura M, Sato M, Kojima Y, Higashikawa A, Shimada M, Ogura K, Mochizuki H, Kono K, Tazaki M, Shibukawa Y (Dept Physiol, Tokyo Dent Coll)
P1-51	Sequential changes in rat cortical responses to periodontal stimulation during experimental tooth movement ○Horinuki E ^{1,2} , Shimizu N ¹ , Koshikawa N ² , Kobayashi M ² (Dept Orthodont, Nihon Univ Sch Dent, ² Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent)
P1-52	Serotonergic modulation of glutamate-evoked responses through 5-HT _{2A} receptors in the dendrites of rat jaw-closing motoneurons ○Dantsuji M ¹ , Nakamura S ¹ , Nakayama K ¹ , Mochizuki A ¹ , Kiyomoto M ¹ , Ozeki M ² , Inoue T ¹ (Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent, ² Dept Implant Dent, Showa Univ Sch Dent)
P1-53	Functional analysis of saliva secretion in type 2 diabetic mouse model ○Munemasa T ¹ , Kondo Y ¹ , Mukaibo T ¹ , Kusuda Y ¹ , Miyagi Y ¹ , Tsuka S ¹ , Masaki C ¹ , Nakamoto T ² , Hosokawa R ¹ (Div Oral Reconstr Rehabil, Kyusyu Dent Univ, ² Dept Prosthodont, Matsumoto Dent Univ)
P1-54	The expression of cell adhesion molecules advancing inferior alveolar nerve regeneration ○Suzuki T ¹ , Kondo M ² , Sugano N ¹ , Iwata K ² , Sato S ¹ (Dept Periodontol, Nihon Univ Sch Dent, ² Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent)
P1-55	Alteration of the jaw-opening reflex excitability after surgery ○Odai-Ide R ¹ , Adachi K ² , Watanabe S ¹ , Sakagami H ² (Div Pediatr, Meikai Univ Sch Dent, ² Div Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent)
P1-56	Inadequate orthodontic wire-induced mucositis pain mechanism ○Ito M ¹ , Ono K ¹ , Hitomi S ¹ , Nodai T ¹ , Gunjigake K ² , Kuroishi K ² , Kawamoto T ² , Inenaga K ¹ (Div Physiol, Kyushu Dent Univ, ² Div Orofac Funct Orthodont, Kyushu Dent Univ)
P1-57	Involvement of endothelin-1 on oral ulcerative mucositis-induced pain in rats ○Nodai T ^{1,2} , Hitomi S ¹ , Ono K ¹ , Ito M ¹ , Masaki C ² , Hosokawa R ² , Inenaga K ¹ (Div Physiol, Kyushu Dent Univ, ² Div Oral Reconstr Rehabil Kyushu Dent Univ)
P1-58	Parasympathetic vasodilation in major salivary glands in type 2 diabetic rats ○Sato T, Ishii H (Div Physiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent)
P1-59	The role of macrophages in ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury ○Batbold D ¹ , Shinoda M ¹ , Yamaguchi S ² , Iwata K ¹ (Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent, ² Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-60	Effects of LPS generated from <i>Porphyromonas gingivalis</i> on muscle mass in the whole body ○Kawamura N ¹ , Ohnuki Y ² , Okumura S ² , Gomi K ¹ , Ujii Y ¹ , Umeki D ³ , Ito A ³ (Dept Periodontol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ³ Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P1-61	Effects of gustatory nerve transection on the licking behavior to quinine-HCl ○Ooki M, Miura H, Saito M (Dept Oral Physiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-62	An application of barometer for assessment of oral functions ○Hiraki K ¹ , Yamada Y ² , Sugiyama T ¹ , Ishida R ¹ (Dept Oral Health Clin Sci, Tokyo Dent Coll, ² Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll)
P1-63	Effect of local GDNF administration on functional recovery of facial sensation following inferior alveolar nerve transection ○Watanabe M ¹ , Shinoda M ² , Sugano N ¹ , Satou S ¹ , Iwata K ² (Dept Periodontol, Nihon Univ Sch Dent, ² Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent)

P1-64	Cbfb1 and Cbfb2 isoforms play important roles in skeletal development ○Jiang Q, Qin X, Komori H, Matsuo Y, Miyazaki T, Moriishi T, Komori T (Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci)
P1-65	Runx signaling is specifically involved in the fusion between the primary palate and the secondary palate by regulating Tgfb3 signaling ○Sarper S, Kurosaka H, Mihara K, Aoyama G, Yamashiro T (Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent)
P1-66	Runx1 and Cbfb in dental enamel epithelium is important for enamel formation in mouse ○Sarper S ¹ , Miura J ² , Yamaguchi S ² , Imasato S ² , Morita C ¹ , Yamashiro T ¹ (¹ Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent, ² Div Interdisci Dent, Osaka Univ Dent Hosp, ³ Dept Biomater Sci, Osaka Univ Grad Sch Dent)
P1-67	Asporin regulates occlusal hypofunction-mediated alveolar bone apposition ○Itohiya K ¹ , Kanzaki H ¹ , Ishikawa M ² , Shimoda S ² , Nakamura Y ¹ (¹ Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Oral Anat, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P1-68	RANKL expressed by osteocytes has a key role for osteoclastogenesis during orthodontic tooth movement ○Shoji A ^{1,2} , Ono T ¹ , Moriyama K ² , Nakashima T ^{1,3,4} (¹ Div Cell Signal, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Div Maxillofac Orthognathics, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ³ Precursory Res for Embryonic Sci Technol (PRESTO), Japan Science and Technology Agency (JST), ⁴ Japan Agency for Medical Research and Development Core Research for Evolutional Science and Technology (AMED-CREST))
P1-69	Retinoic acid affects craniofacial patterning by regulating sonic hedgehog signaling ○Wang Qi, Yamashiro T, Kurosaka H (Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent)
P1-70	Are osteoclasts induced in the presence of inflammatory cytokines related to the pathologically activated osteoclasts ? ○Shiratori T ^{1,3} , Kukita A ² , Uehara N ¹ , Kyumoto Y ¹ , Zhang JQ ¹ , Yamaza T ¹ , Koyano K ³ , Kukita T ¹ (¹ Sect Mol Cell Biol Oral Anat Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Div Microbiol Fac Med Saga Univ, ³ Sect Implant Rehabil Dent Kyushu Univ Grad Sch Dent)
P1-71	DSPP-derived proteins are transient components of root dentin ○Niwa T ¹ , Nagano T ¹ , Gomi K ¹ , Yamakoshi Y ² (¹ Dept Periodontol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P1-72	Histological examination on the effect of tooth storage media on the periodontal tissue regeneration ○Hasan R ^{1,2} , Takebe H ¹ , Irie K ¹ , Saito T ² (¹ Div Histol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, ² Div Clinic Cariol Endodont, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent)
P1-73	The effects of neurokini-1 receptor knockdown on substance P-induced osteogenic differentiation in mouse osteoblast ○Toyodome S ^{1,2} , Kuramoto E ¹ , Iwai H ¹ , Yamanaka A ¹ , Yoshimura T ² , Nakamura N ² , Goto T ¹ (¹ Dept Anat Oral Sci, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Dept Oral Maxillofac Surg, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-74	Bilirubin induces cell death of human deciduous teeth-derived stem cells ○Tomoda E ^{1,2} , Yamaza T ¹ , Yamaza H ² , Tanaka Y ¹ , Sonoda S ¹ , Nonaka K ² , Kukita T ¹ (¹ Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Sect Pediatr Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
P1-75	Role of $\beta 1$ integrin in branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands ○Adachi K ¹ , Mizukoshi K ² , Koyama N ² , Muramatsu Y ¹ , Kashimata M ² (¹ Dept Oral Maxillofac Surg, Asahi Univ Sch Dent, ² Dept Dent Pharmacol, Asahi Univ Sch Dent)
P1-76	The role of IGF binding protein 5 in the healing process of dental pulp following tooth crown transplantation into the sublingual region ○Saito K, Ohshima H (Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-77	CD91 expression of mesenchymal stromal cells in socket of tooth extraction ○Ninomiya T ¹ , Hosoya A ² , Nakamura H ² (¹ Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ, ² Dept Oral Histol, Matsumoto Dent Univ)
P1-78	Tactile allodynia in OVA-induced asthma model mice ○Cao AL ^{1,2} , Yoshimoto R ³ , Aijima R ² , Zhang JQ ¹ , Kido M ² (¹ Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent Sci, ² Div Anat Physiol, Saga Med Sch, ³ Sect Periodontol, Kyushu Univ Grad Sch Dent Sci)
P1-79	Localization of septoclasts in mouse Meckel's cartilage ○Sakashita H ^{1,2} , Bando Y ¹ , Sakiyama K ¹ , Amano O ¹ (¹ Div Anat, Meikai Univ Sch Dent, ² Div Oral Maxillofac Surg II, Meikai Univ Sch Dent)
P1-80	A basement membrane protein Nephronectin regulates the proliferation of dental epithelial stem cell through its EGF like repeat domain ○Arai C ¹ , Yoshizaki K ¹ , Miyazaki K ¹ , Han X ¹ , Funada K ¹ , Fukumoto S ² , Takahashi I ¹ (¹ Sect Orthod Dentofac Orthop, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
P1-81	Three-dimensional somatotopic organization of the rat trigeminal ganglion: A combined study using tissue clearing and fluorescent retrograde tracers ○Sendo R ^{1,2} , Iwai H ¹ , Kuramoto E ¹ , Yoshimura N ¹ , Yamaguchi R ¹ , Yamanaka A ¹ , Toyodome S ^{1,3} , Sugimura M ² , Goto T ¹ (¹ Dept Anat Oral Sci, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Dept Dent Anesthesiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, ³ Dept Oral Maxillofac Surg, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-82	Migration and differentiation into palatal glands of transplanted bone marrow-derived cells ○Ootani Y ¹ , Tamamura R ¹ , Kono T ¹ , Suzuki K ² , Nakano K ³ , Nagatsuka H ³ , Tsujigiwa H ⁴ , Okada H ¹ (¹ Dept Histol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, ² Dept Biol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, ³ Dept Oral Pathol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, ⁴ Lab Histopathol, Dept Life Sci, Fac Sci, Okayama Univ of Sci)
P1-83	The role of myoepithelial cells in salivary gland morphogenesis ○Ikai K, Ono H, Sakai T (Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent)
P1-84	Essential roles of H3K9MTase G9a during tooth development ○Kamiunten T ¹ , Ideno H ² , Shimada A ² , Nakamura Y ¹ , Kimura H ³ , Tachibana M ⁴ , Nakashima K ² , Nifuji A ² (¹ Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Pharmacol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ³ Dept Biological Sci, Grad Sch Biosci Biotechnol, Tokyo Inst of Technol, ⁴ Inst for Enzyme Res, Tokushima Univ)

P1-85	Elucidation of the neuronal differentiation induction mechanism by periodontal ligament cells by adding a mechanical stimulus ○Takahashi K, Yoshida T, Wakamori M (Div Mol Pharmacol Cell Biophys, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
P1-86	Analysis of cytoskeleton in normal cells surrounding cancer cells ○Kitagawa N, Ohtani T, Inai T (Dept Morpho Biol, Fukuoka Dent Coll)
P1-87	The role of epiprofin and T-box1 in enamel epithelial development ○Sakai K ^{1,3} , Yoshizaki K ^{2,3} , Chiba Y ² , Ikeuchi T ³ , Yamamoto A ¹ , Hibi H ¹ , Yamada Y ³ (Dept Maxillofac Surg, Nagoya Univ Grad Sch Med, ² Dent Sect Orthod Dentofac Orthop, Kyushu Univ Grad Sch, ³ NIH NIDCR)
P1-88	Metatranscriptomic analyses of microbiota in peri-implantitis and periodontitis lesions ○Watanabe T ¹ , Shiba T ² , Kachi H ³ , Takeuchi Y ² , Maruyama F ⁴ , Izumi Y ² , Nakagawa I ⁴ (Lab Food-borne Pathog Microbiol, Res Center for Food Safety, Grad Sch Agri & Life Sci, The Univ of Tokyo, ² Div Periodontol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ³ Div Maxillofac Surg, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ⁴ Dept Microbiol, Kyoto Univ Grad Sch Med)
P1-89	<i>Streptococcus pyogenes</i> -produced endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q ○Ogawa M, Sumitomo T, Mori Y, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S (Dept Oral, Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent)
P1-90	A relationship between secretion of short chain fatty acids and producing gingipains in <i>Porphyromonas gingivalis</i> ○Sato M ¹ , Yoshida Y ² , Nagano K ² , Hasegawa Y ² , Takebe J ¹ , Yoshimura F ² (Div Partial Denture, Aichi Gakuin Univ Sch Dent, ² Div Microbiol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent)
P1-91	Carbohydrate metabolism of oral <i>Bifidobacterium</i> and its inhibition by fluoride ○Manome A ¹ , Abiko Y ^{2,3} , Kawashima J ⁴ , Fukumoto S ¹ , Takahashi N ² (Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ² Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ³ Liaison Center Innovative Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ⁴ Div Community Oral Health Sci, ToMMo, Tohoku Univ)
P1-92	The effects of fructanase on the competence-stimulating peptide-dependent quorum sensing system in <i>Streptococcus mutans</i> ○Suzuki Y ^{1,2} , Arai T ^{1,3} , Ogura N ² , Kondoh T ² , Senpuku H ¹ (Dept Bacteriol 1, Natl Inst of Infect Dis, ² Dept Maxillofac Surg, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, ³ Dept Oral and Maxillofac Surg, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P1-93	Novel strategy for biofilm inhibition using small molecules targeting molecular chaperone DnaK ○Arita-Morioka K ¹ , Nagao J ² , Narita Y ⁴ , Hashimoto M ² , Tasaki S ² , Ikezaki S ² , Cho T ² , Tanaka Y ² (Adv Sci Res Cent, Fukuoka Dent Coll, ² Div Infect Biol, Fukuoka Dent Coll)
P1-94	<i>Porphyromonas gingivalis</i> manages complement and TLR signaling to escape bacterial clearance of inflammation ○Maekawa T ¹ , Maeda T ¹ , Terao Y ² (Res Cent for Adv Oral Sci, Niigata Univ, Grad Sch Med Dent Sci, ² Div Microbiol Infect Dis, Niigata Univ, Grad Sch Med Dent Sci)
P1-95	Ameloblastin enhances the inflammatory response in LPS-treated human macrophage cells ○Otsuka M ^{1,2} , Okinaga T ¹ , Ariyoshi W ¹ , Kitamura C ² , Nishihara T ¹ (Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ, ² Div Endodont, Restorative Dent, Kyushu Dent Univ)
P1-96	Functional analysis of <i>marR</i> -like gene of <i>Treponema denticola</i> ○Numata Y ¹ , Shibayama K ² , Sato T ¹ , Kikuchi Y ² , Kokubu E ² , Ishihara K ² (Dept Crown Bridge Prosthodont, Tokyo Dent Coll, ² Dept Microbiol, Tokyo Dent Coll)
P1-97	Functional analysis of a novel T-cell signaling molecule associated with allergic response ○Hashimoto M ^{1,2} , Nagao J ¹ , Tasaki S ¹ , Ikezaki S ¹ , Narita Y ¹ , Arita-Morioka K ¹ , Cho T ¹ , Yuasa K ² , Tanaka Y ¹ (Div Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll, ² Div Image Diagn, Dept Diagno Gene Care, Fukuoka Dent Coll)
P1-98	Competence-induced protein Ccs4 impacts virulence of <i>Streptococcus pneumoniae</i> ○Hirose Y, Yamaguchi M, Goto K, Sumitomo T, Nakata M, Kawabata S (Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent)
P1-99	Induction of T cell response in the regulation for oral candidiasis ○Tasaki S ^{1,2} , Cho T ¹ , Nagao J ¹ , Narita Y ¹ , Hashimoto M ¹ , Ikezaki S ¹ , Arita-Morioka K ¹ , Kojima H ² , Tanaka Y ¹ (Div. Infect. Biol, Dept Funct. Biosci, Fukuoka Dent Coll, ² Div Dent for the Disabled, Dept Oral Growth and Dev, Fukuoka Dent Coll)
P1-100	Effects of novel compounds on periodontopathic bacteria ○Fujiwara N ^{1,2} , Murakami K ¹ , Yumoto H ³ , Hirota K ¹ , Ozaki K ² , Miyake Y ¹ (Dept Oral Microbiol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci, ² Dept Oral Health Care Promo, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci, ³ Dept Conserv Dent, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci)
P1-101	The roles of omega-3 fatty acid in the macrophage differentiation ○Kawano A ^{1,2} , Okinaga T ² , Hikiji H ¹ , Ariyoshi W ² , Nishihara T ² (Dept Oral Health Manage, Kyushu Dent Univ, ² Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ)
P1-102	Involvement of inflammasome in IL-1 α -inducing activity of <i>Streptococcus sanguinis</i> ○Saeki A ¹ , Hasebe A ¹ , Kamezaki R ¹ , Suzuki T ² , Shibata K ¹ (Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Div Bacter Pathogenesis, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-103	Molecular analyses of CAMP factor and PI3K/Akt signaling pathway on adhesion and invasion of <i>Streptococcus pyogenes</i> to human pharyngeal epithelial cells ○Kurosawa M ^{1,2} , Oda M ¹ , Domon H ¹ , Saitoh I ² , Hayasaki H ² , Terao Y ¹ (Div Microbiol Infect Dis, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Div Pediatr Dent, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-104	Activation of inflammasome by genomic DNA of <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ○Kamezaki R ^{1,2} , Saeki A ¹ , Hasebe A ¹ , Kitagawa Y ² , Suzuki T ³ , Shibata K ¹ (Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Dept Oral Diagn Med, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ³ Div Bacter Pathogenesis, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-105	The sequence analysis of the novel <i>Veillonella</i> species isolated from tongue biofilm of Thai children ○Mashima I ^{1,2} , Theodora C ² , Nakazawa F ² (Postdoc. JSPS, ² Div Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent)
P1-106	Effects of mild heat stress on biofilm formation of <i>Candida albicans</i> ○Ikezaki S ¹ , Cho T ¹ , Tasaki S ¹ , Hashimoto M ¹ , Narita Y ¹ , Nagao J ¹ , Arita-Morioka K ¹ , Ikebe T ² , Tanaka Y ¹ (Div Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll, ² Div Oral and Maxillofac Surg, Fukuoka Dent Coll)

P1-107	Enzymatic properties of quinol peroxidase of aggressive periodontopathic bacterium ○Abe T, Kawarai T, Takahashi Y, Konishi K (Dept Microbiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P1-108	The distribution and frequency of oral <i>Veillonella</i> species in saliva from Thai children associated with oral hygiene status ○Theodorea C ^{1,2} , Mashima I ^{1,3} , Nakazawa F ¹ (Div Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, ² Dept Oral Biol, Fac Dent, Univ Indonesia, ³ Postdoc Research Fellowship for Young Scientists, JSPS)
P1-109	Identification and characterization of dendritic cells in murine salivary glands ○Lu L ^{1,2} , Tanaka Y ^{2,3} , Sugawara S ² (Div Oral Diag, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ² Div Oral Immunol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ³ Div Ped Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
P1-110	Development of oral indigenous microbiota and factors associated with its maturation in early childhood ○Asakawa M, Takeshita T, Kageyama S, Yamashita Y (Sect Prevent Dent Public Health, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
P1-111	Salivary microbiome reflects the severity of periodontitis ○Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Yamashita Y (Sect Prevent Dent Public Health, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
P1-112	Analyses of locally recruiting T cells in the oral mucosa inflammation ○Hirunwidchayarat W, Ohno T, Kang SW, Nagai S, Azuma M (Div Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-113	Analysis of effective component produced by oral probiotic candidates against <i>C. albicans</i> ○Kojima Y, Ohshima T, Kawai T, Maeda N (Dept Oral Microbiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P1-114	Quantification of mutans streptococci in children's plaques and its relationship to the caries prevalence ○Makinae T ¹ , Shimoyama Y ² , Tanaka M ¹ , Ishikawa T ² , Kodama Y ² , Sasaki M ² , Ohara-Nemoto Y ³ , Nemoto T ³ , Kimura S ⁴ (Div Pediatr Dent, Iwate Med Univ, ² Div Mol Microbiol, Iwate Med Univ, ³ Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, ⁴ Dept Oral Hygiene, Kansai Women's Coll)
P1-115	Rat subcutaneous tissue reaction to bioabsorbable suture thread ○Nakayasu Y ¹ , Matsuda S ¹ , Shoumura M ² , Osuga N ² , Kawakami T ¹ (Hard Tissue Pathol, Matsumoto Dent Univ Grad Sch, ² Oral Health Anal, Matsumoto Dent Univ Grad Sch)
P1-116	Intercellular crosstalk defined by exosomes from oral squamous carcinoma cells determines its pathological process ○Morioka M ^{1,2} , Kawakubo-Yasukochi T ² , Nakamura S ¹ (Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Dept Immun Mol, Fukuoka Univ Fac Pharm Sci)
P1-117	Expression and function of kallikrein-related peptidase 6 in oral squamous cell carcinoma ○Kaneko N, Kawano S, Hashiguchi Y, Nakamura S (Sect Oral Maxillofac Surg, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
P1-118	Melanin pigmentation of odontogenic tumor ○Isomura M ¹ , Sato N ¹ , Kawai R ¹ , Jinno M ¹ , Honda Y ¹ , Torii Y ¹ , Yoshida W ^{1,2} , Sugita Y ^{1,2} , Kubo K ^{1,2} , Maeda H ^{1,2} (Div Oral Pathol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, ² Res Inst of Adv Oral Sci, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent)
P1-119	Effect of cognitive impairment on the metabolic profile of saliva of mice ○To M ¹ , Sugimoto M ^{2,3} , Saruta J ⁴ , Yamamoto Y ⁵ , Matsuo M ¹ , Tsukinoki K ² (Div Dent Anat, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, ² Div Environ Pathol, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, ³ Inst Adv Biosci, Keio Univ, ⁴ Div Saliva Heal Med, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, ⁵ Dept Hygiene Kanagawa Dent Univ Sch Dent Junior Coll)
P1-120	Analysis of TRP channels in human oral squamous cell carcinoma ○Aijima R ^{1,2} , Yoshimoto R ³ , Cao AL ^{1,4} , Mori K ² , Zhang JQ ⁴ , Ohsaki Y ⁴ , Danjo A ² , Yamashita Y ² , Kiyoshima T ³ , Kido M ¹ (Div Histol & Neuroana, Fac Med, Saga Univ, ² Dept Oral & Maxillofac Surg, Fac Med, Saga Univ, ³ Sect Oral Pathol, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ⁴ Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
P1-121	Is chemokine CXCL14, a multi-step tumor suppressor, a differentiation regulator of squamous epithelial cells? ○Ikoma T ¹ , Yang X ^{2,3} , Ozawa S ¹ , Maehata Y ² , Hata R ^{2,3} (Dept Oral Maxillofac Surg, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ, ² Dept Oral Sci, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ, ³ Oral Health Sci Res Center, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ)
P1-122	Ubiquitin proteasome pathway regulates Borealin stability and its significance ○Tsunematsu T, Kudo Y, Yamada A, Arakaki R, Ishimaru N (Dept Oral Mol Pathol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci)
P1-123	Expression and function of microRNA-205 in oral squamous cell carcinoma ○Hashiguchi Y, Kawano S, Kaneko N, Nakamura S (Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
P1-124	Key roles of TLR2 in NASH pathological progression by <i>P.gingivalis</i> odontogenic infection ○Furusho H, Nagasaki A, Miyauchi M, Takata T (Dept Oral Maxillofac Pathobiol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci)
P1-125	Inhibitor of Gli (GANT61) induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma ○Mikami Y ¹ , Nagata K ² , Wada H ² , Fujii S ² , Abe M ³ , Yoshimoto R ² , Kiyoshima T ² , Nakamura S ¹ (Sect Oral Maxillofac Oncol, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Sect Oral Pathol, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ³ Sect Oral Maxillofac Surg, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
P1-126	Aberant DNA methylations in gingival epithelial cells stimulated with arecoline ○Adhikari B ¹ , Uehara O ² , Shimizu A ¹ , Hiraki D ¹ , Morikawa T ¹ , Neopane P ¹ , Takai R ³ , Sato J ¹ , Nishimura M ¹ , Abiko Y ¹ (Div Oral Med Pathol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, ² Div Dis Control Mol Epidemiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, ³ Div Pediatr Dent, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent)
P1-127	Upregulated expressions of stem cell markers in Epithelial cell rests of Malassez stimulated with epigenetic agents ○Yoshida K ¹ , Morikawa T ¹ , Adhikari B ¹ , Harada F ¹ , Chujo T ¹ , Uehara O ² , Sato J ¹ , Nishimura M ¹ , Saitoh M ³ , Abiko Y ¹ (Div Oral Med Pathol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, ² Div Dis Control Mol Epidemiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, ³ Div Pediatr Dent, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent)

P1-128	17 α -estradiol prevents GABA functional switch to excitatory via regulating GPR30-SPAK-KCC2 signaling ○Tsukahara T ¹ , Furukawa M ² , Sato T ¹ (¹ Dept Appl Pharmacol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Dept Orthodont, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-129	Elucidation of the role of Nr4a1 in drug induced gingival overgrowth ○Okanobu A, Matsuda S, Kajiya M, Fujita T, Kurihara H (Dept Periodontal Med, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci)
P1-130	Prolonged survival and improved bone structure of lethal hypophosphatasia model mice by rAAV-mediated high dose expression of alkaline phosphatase ○Takahashi A ^{1,3} , Ikeue R ² , Hirai Y ³ , Kasahara M ¹ (¹ Dept Pharmacol, Tokyo Dent Coll, ² Dept Crown Bridge Prosthodont, Tokyo Dent Coll, ³ Dept Biochem Mol Biol, Nippon Med Sch)
P1-131	The effects of etidronate on human bone-type alkaline phosphatase activity activated by Mg, Ca or Zn ○Shimada H ¹ , Suzuki K ² , Yoshimura Y ² , Minamikawa H ² , Yamazaki Y ² (¹ Dept Gerodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Dept Mol Cell Pharmacol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P1-132	The role of cathepsin S in Th17 cell differentiation by <i>Porphyromonas gingivalis</i> lipopolysaccharide ○Dekita M ^{1,2} , Wu Z ² , Nakanishi H ² , Takahashi I ¹ (¹ Sect Orthod Dentofac Orthop, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Sect Aging Sci Pharmacol, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
P1-133	Mechanism of tumor suppression by sonoporation: Synergistic effects of antibody-conjugated microbubble and ultrasound in oral cell carcinoma ○Hirabayashi F ^{1,2} , Iwanaga K ² , Okinaga T ¹ , Ariyoshi W ¹ , Nishihara T ¹ (¹ Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ, ² Div Oral Maxillofac Surg, Kyushu Dent Univ)
P1-134	Osteoclast differentiation is directly downregulated by lactoferrin ○Yoshimura Y ¹ , Kato H ^{1,2} , Minamikawa H ¹ , Suzuki K ¹ , Yamazaki Y ² (¹ Dept Mol Cell Pharmacol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Dept Gerodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P1-135	Effects of remifentanyl on internal carotid artery blood flow and oral tissue blood flow during sevoflurane anesthesia in rabbits ○Hirata A ¹ , Kasahara M ² , Ichinohe T ³ (¹ Dept Dent Anesthesiol, Tokyo Dent Coll Grad Sch Dent, ² Dept Pharmacol, Tokyo Dent Coll, ³ Dept Dent Anesthesiol, Tokyo Dent Coll)
P1-136	Effects of recombinant human amelogenin on the differentiation of rat ameloblast cells and mouse osteoblastic cells ○Takahashi A ¹ , Morita T ² , Murata K ¹ , Saitoh M ¹ , Tanimura A ² (¹ Div Pediatr Dent, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, ² Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent)
P1-137	Search for new pain control material for orthodontic treatment-induced pain ○Hasegawa N ¹ , Sasaki A ¹ , Tsuchiya T ¹ , Sakagami H ² , Adachi K ² , Suda N ¹ (¹ Div Orthod Dept Human Dev Foster, Meikai Univ Sch Dent, ² Div Pharmacol Dept Diagn Ther Sci, Meikai Univ Sch Dent)
P1-138	Analysis of the calcium responses in the differentiation and migration of rat dental epithelial cells ○Murata K ¹ , Fukumoto S ³ , Morita T ² , Takahashi A ¹ , Saitoh M ¹ , Tanimura A ² (¹ Div Pediatr Dent, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, ² Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido, Sch Dent, ³ Div Pediatr Dent, Dept Oral Health Dev Sci, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
P1-139	Filaggrin expression and degradation process in the skin and the oral mucosa ○Arita S ¹ , Hatta M ² , Ryu T ¹ , Sakagami R ¹ , Yamazaki J ² (¹ Div Periodontol, Fukuoka Dent Coll, ² Div Cell Mol Regul, Fukuoka Dent Coll)
P1-140	Injection of RANKL-binding peptide OP3-4 promotes BMP-2-induced maxilla augmentation in mice ○Uehara T ¹ , Tamura Y ² , Miyashin M ¹ , Aoki K ² (¹ Div Pediatr Dent, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Div Pharmacol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P1-141	The effectiveness of Pilocarpine for dry mouth patients -long-term medication for human and mouse - ○Ono H, Ikai K, Sakai T (Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent)
PS-1	Three-dimensional analysis of arrangement and connections of mouse mesencephalic trigeminal neurons using brain-clearing techniques ○Yamaguchi R ¹ , Yoshimura N ¹ , Sendo R ^{1,2} , Kuramoto E ¹ , Iwai H ¹ , Yamanaka A ¹ , Toyodome S ^{1,2} , Goto T ¹ (¹ Dept Anat Oral Sci, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Dept Dent Anesthesiol, Grad Sch Med Dent Sci, Kagoshima Univ, ³ Dept Oral Maxillofac Surg, Grad Sch Med Dent Sci, Kagoshima Univ)
PS-2	<i>Fusobacterium nucleatum</i> -induced production of neutrophil extracellular traps by human neutrophils ○Numazaki K ¹ , Nishioka T ² , Matsushita K ³ , Tada H ¹ (¹ Div Oral Microbiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ² Div Oral Diag, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ³ Dept Oral Dis Res, NCGG)
PS-3	The Zn ²⁺ level in saliva and relationship with other saliva markers of healthy subjects ○Hata F ¹ , Katsuragi H ² (¹ Nippon Dent Univ at Niigata, ² Dept Microbiol, Nippon Dent Univ at Niigata)
PS-4	Induction of a subtilisin-like proprotein convertase PACE4 in regeneration model of salivary gland -Part II- ○Shimatani T ^{1,2} , Minegishi M ^{1,3} , Akamatsu T ^{1,4} , Yao C ¹ , Hasegawa T ¹ , Yoshimura H ¹ (¹ Dept Mol Oral Physiol, Inst Biomed Sci, Tokushima Univ Grad Sch, ² 4th grade, Fac Dent, Tokushima Univ, ³ 6th grade, Fac Dent, Tokushima Univ, ⁴ Field Biomol Func & Technol, Grad Sch Biosci & Bioind, Tokushima Univ)
PS-5	Inhibitory effect of local anesthetics on the muscarinic receptor-mediated Ca ²⁺ responses in HSY human salivary cell line ○Shimatani M, Iwata A, Nezu A, Tanimura A (Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent)
PS-6	Visualization of the three-dimensional structures of teeth and periodontal tissues with new tissue clearing technology ○Seki Y, Ishida N, Tanimura A (Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent)
PS-7	Histochemical examination on mandibular periodontal tissues of obese type II diabetic SDT fatty rats ○Yoshida T ¹ , Hongo H ² , Tsuboi K ² , Hasegawa T ² , Amizuka N ² (¹ Hokkaido Univ Sch Dent Med, ² Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)

PS-8	Binding ability of TGF- β receptors and amelogenin-TGF- β complex in porcine immature enamel ○Noda C ¹ , Fujinami S ¹ , Yamamoto R ² , Kobayashi S ³ , Oida S ² , Yamakoshi Y ² (¹ 4th grade, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ³ Dept Ped Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
PS-9	Quantitative analysis of <i>Hey1</i> and <i>Hey2</i> gene expression during mouse tooth development ○Kibe K ¹ , Nakatomi M ² , Kataoka S ² , Toyono T ² , Seta Y ² (¹ 5th grade, Kyushu Dent Univ, ² Div Anat, Kyushu Dent Univ)
PS-10	Ultrastructural assessment on osteocytes in <i>c-fos</i> deficient mice ○Abe M ¹ , Hasegawa T ² , Yamamoto T ² , Tsuchiya E ² , Udagawa N ³ , Amizuka N ² (¹ Sch Dent Med, Hokkaido Univ, ² Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ, ³ Dept Oral Biochem, Sch Dent, Matsumoto Dent Univ)
PS-11	“Social” jet lag in mice ○Nakanishi Y ^{1,2} , Kusano S ^{1,2} , Takasu N ^{2,3} , Nakamura W ² (¹ Dept Dent, Osaka Univ, ² Lab Oral Chronobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent, ³ JSPS (RPD))
PS-12	Early night exposure to lights causes “social” jet-lag ○Kusano S ^{1,2} , Nakanishi Y ^{1,2} , Takasu N ^{2,3} , Nakamura W ² (¹ Dept Dent, Osaka Univ, ² Lab Oral Chronobiol Osaka Univ Grad Sch Dent, ³ JSPS (RPD))
PS-13	Effect of serum-free/xeno free media on human dental pulp cellsA ○Kato M ¹ , Otani K ² , Hamamura K ³ , Honda M ¹ (¹ Div Oral Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, ² Adv Center for Tissue Engineering Ltd, ³ Div Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent)

(August 26, 15 : 40-16 : 40)

P2-1	Relationship between the mylohyoid and the vein distribution in the antero-lingual region of the mandible ○Sakiyama K, Bando Y, Komine Y, Miyake G, Taira F, Sakashita H, Amano O (Div Anat, Meikai Univ Sch Dent)
P2-2	Influence of hearing organ size on masseter architecture ~A case study in two desert rodents~ ○Sato K, Yano W, Watanabe R, Ejiri S (Dept Oral Anat, Asahi Univ Sch Dent)
P2-3	Expression of Tenomodulin at embryonic and early postnatal mouse masticatory muscle ○Sato I, Miwa Y, Azuma Y, Sunohara M (Dept Anat, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P2-4	Newborn and embryo mice exposed prenatally to ethanol show abnormal behavior and morphological defects caused from abnormal activity of microglia in neocortex ○Komada M ¹ , Nagao T ² , Ikeda Y ¹ (¹ Dev Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, ² Dept Life Sci Fac Sci Engineering, Kinki Univ)
P2-5	A novel transgenic mice explains pleiotropic congenital cardiac defects of TRPS patients ○Nomir A ^{1,2} , Takeuchi Y ^{1,3} , Fujikawa J ^{1,4} , Abe M ¹ , Wakisaka S ¹ (¹ Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent, ² Dept Anat Embryo, Fac Vet Med, Damanhour Univ, ³ Dept Orthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent, ⁴ Div Spec Needs Dent, Osaka Univ Dent Hosp)
P2-6	Sexual dimorphism of the maxillary first premolar sizes in Fijian population ○Sasaki K, Kondo S (Dept Anat, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo)
P2-7	Guaiacol shows analgesic effect by acting in rat trigeminal ganglion neurons ○Shimada M, Kimura M, Sato M, Higashikawa A, Kojima Y, Tazaki M, Shibukawa Y (Dept Physiol, Tokyo Dent Coll)
P2-8	Cloning of immortal porcine pulp cells and BMP2- and TGF β -induced odontoblastic differentiation ○Karakida T, Oida S, Yamamoto R, Saito M, Yamakoshi Y (Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P2-9	The developmental studies on the differentiation into the odontoblasts as sensory receptor ○Tanaka A, Shibukawa Y, Ishikawa N, Tazaki M, Yamamoto H, Shintani S (Dept Pediatr Dent, Tokyo Dent Coll)
P2-10	Detection of AGEs crosslinks in dentin collagen ○Shimizu M, Miura J (Div Interdisci Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent)
P2-11	Immunohistochemical localization of enamel matrix protein-like proteins in tooth enameloid of spotted gars, <i>Lepisosteus oculatus</i> , a bony fish ○Sasagawa I ¹ , Yokusuka H ² , Ishiyama M ² , Mikami M ³ (¹ Adv Res Cent, Nippon Dent Univ at Niigata, ² Dept Histol, Nippon Dent Univ at Niigata, ³ Dept Microbiol, Nippon Dent Univ at Niigata)
P2-12	Characterization of neural crest cells derived from human induced pluripotent stem cells ○Toriumi T ¹ , Kawano E ² , Isokawa K ¹ , Honda M ³ (¹ Dept Anat, Nihon Univ Sch Dent, ² Nihon Univ Grad Sch Dent, ³ Div Oral Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent)
P2-13	Effect of the occlusal stimuli on osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells ○Takahashi T, Takita H, Ushijima N, Iizuka T (Support Sect Educ Res, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P2-14	Effects of dyslipidemia on osteoclastogenesis ○Ohgi K ¹ , Kajiji H ² , Okamoto F ² , Sakagami R ¹ , Okabe K ² (¹ Dept Odontol, Fukuoka Dent Coll, ² Dept Physiol Sci Mol Biol, Fukuoka Dent Coll)
P2-15	Synthetic oligopeptide kinetics in porous calcium materials ○Tominaga K ¹ , Takeuchi T ² , Honda S ² , Okamura T ¹ , Wato M ¹ , Nishikawa T ³ , Tanaka A ¹ (¹ Dept Oral Pathol, Osaka Dent Univ, ² Pathol, Osaka Dent Univ Grad Sch Dent, ³ Inno Dent Edu Osaka Dent Univ)
P2-16	Relationships between the expression of SDF-1 and CXCR4 in the periodontal tissues using hyperocclusion model mice ○Goto K ¹ , Kajiji H ² , Tsutsumi T ³ , Okabe K ² (¹ Dept Dent Hygiene, Fukuoka Coll of Health Sci, ² Div Cell Physiol, Fukuoka Dent Coll, ³ Div Removal Prosthodont, Fukuoka Dent Coll)

P2-17	Microvascular changes of alveolar bone after application of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) ○Matsuo M, Okudera T, Yamamoto R, Tou M (Dept Oral Sci, Div Dent Anat, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent)
P2-18	Histological study of alveolar bone regeneration after application of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) ○Okudera T ¹ , Tou M ¹ , Miyoshi Y ² , Takagaki-Mikuni Y ² , Yamamoto R ¹ , Matsuo M ¹ (¹ Dept Oral Sci, Div Dent Anat, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, ² Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent)
P2-19	Effect of Er:YAG laser irradiation for TGF- β in cultured human periodontal ligament cells ○Kobayashi K ¹ , Niwa T ² , Yamakawa S ³ , Saito M ⁴ , Yamamoto R ¹ , Yamakoshi Y ⁴ (Dept Dent Hyg, Tsurumi Jr Coll, ² Dept Periodont, Tsurumi Univ, Sch Dent Med, ³ Dept Endodont, Tsurumi Univ, Sch Dent Med, ⁴ Dept Biochem Mol Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P2-20	Sodium-dependent phosphate cotransporters, Pit-1 and Pit-2, are essential in the calcification by human periodontal ligament cell ○Ishikawa M ¹ , Itohiya K ² , Takano Y ² , Nakamura Y ² , Shimoda S ¹ (¹ Dept Oral Anat, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P2-21	Study of optimal concentration in the experiments with S-PRG filler eluate to human gingival fibroblasts ○Inoue H ¹ , Goda S ² , Nishikawa Y ¹ (¹ Dept Physiol, Osaka Dent Univ, ² Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent)
P2-22	The detection of oxytalan fiber produced human periodontal ligament cells using wheat germ agglutinin ○Kamogashira N ¹ , Fujita T ¹ , Nakashima K ¹ , Matsuda Y ¹ , Hatakeyama J ³ , Hatakeyama Y ² , Sawa Y ² , Ishikawa H ¹ (¹ Div Orthodont, Fukuoka Dent Coll, ² Div Funct Struct, Fukuoka Dent Coll, ³ Div Oper Dent Endod, Fukuoka Dent Coll)
P2-23	Functional analysis of transcriptional co-factor YAP during salivary gland development in mice ○Kitagawa M, Hirono C, Sugita M (Dept Oral Physiol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci)
P2-24	EGF/ErbB/ERK1/2 signaling regulates branching morphogenesis of submandibular gland rudiment through activation of Shh/Ptch/Gli signaling system ○Mizukoshi K, Koyama N, Kashimata M (Dept Dent Pharmacol, Asahi Univ Sch Dent)
P2-25	Cdc42-PAK pathway contributes to maintain tubular organs ○Shitara A (LCMB, CCR, NCI, NIH)
P2-26	The functional analysis of the pillar cells in granular ducts of mouse submandibular glands ○Nonaka N, Nakamura M (Dept Oral Anat Dev Biol, Showa Univ Sch Dent)
P2-27	Sexual difference in regeneration of salivary gland ○Akamatsu T ^{1,2} , Yao C ¹ , Hasegawa T ¹ , Yoshimura H ¹ (¹ Dept Mol Oral Physiol, Inst Biomed Sci, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci, ² Field Biomol Func & Technol, Grad Sch Biosci & Bioind, Tokushima Univ)
P2-28	Interaction between injury side and non-injury side in salivary gland ○Yokoyama M, Katsumata-Kato O, Fujita-Yoshigaki J (Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo)
P2-29	Regulation of microRNAs in mouse salivary glands: a putative bio-marker of stress-dependent diseases under partial androgen deficiency in aging males (PADAM) ○Kurihara K, Muramoto K (Div Physiol, Meikai Univ Sch Dent)
P2-30	Enhancement of salivary secretions and changes of gene expression by previous administration of pilocarpine ○Morita T, Nezu A, Tanimura A (Div Pharmacol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent)
P2-31	Effects of liquid diet on acinar cells in submandibular and sublingual glands of growing rats ○Takahashi S ¹ , Uekita H ² , Taniwaki H ¹ , Inoue K ¹ , Doman T ¹ (¹ Dept Oral Functional Anat, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Dept Crown Bridge Prosthodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P2-32	The daily variation of umami-induced salivation in minor salivary glands ○Furuyama A, Ohsuga K, Kawai H (Div Oral Func Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent)
P2-33	Analyses of gene expression in SNARE-gene knockout HAP1 cells ○Arakawa T ¹ , Hosiriluck N ^{1,2} , Okayama M ² , Mizoguchi I ² , Takuma T ¹ (¹ Div Biochem, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, ² Div Orthod Dentofac Orthop, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent)
P2-34	The salivary IgA flow rate is increased by high concentrations of short-chain fatty acids in the cecum of rats ingesting fructooligosaccharide ○Yamamoto Y ¹ , To M ² , Saruta J ² , Tsukinoki K ² (¹ Dept Dent Hygiene, Kanagawa Dent Univ, Jr Coll, ² Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent)
P2-35	Effects of peptidoglycan binding to salivary histatin on Toll-like receptor 2 signaling ○Imamura Y ¹ , Wang PL ² , Sogawa N ¹ (¹ Dept Dent Pharmacol, Matsumoto Dent Univ, ² Dept Bacteriol, Osaka Dent Univ)
P2-36	2D-PAGE analysis of saliva from non-obese diabetic (NOD) mice and human subjects ○Sato R ^{1,2} , Nashida T ² , Mizuhashi F ³ , Yoshimura K ⁴ , Shimomura-Kuroki J ⁵ (¹ Nippon Dent Univ Coll at Niigata, ² Dept Biochem, Nippon Dent Univ at Niigata, ³ Dept Remov Prosthodont, Nippon Dent Univ at Niigata, ⁴ Dept Anat, Nippon Dent Univ at Niigata, ⁵ Dept Pediatr Dent, Nippon Dent Univ at Niigata)
P2-37	LC-MS analysis of lipid component between mature and immature secretory granules in the rat parotid gland ○Kato O, Yokoyama M, Yoshigaki J (Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo)
P2-38	pH monitoring of oral saliva during sleep ○Nakamura A, Watanabe T, Nakamura N, Sasabe T, Watanabe K, Watanabe S (Div Oral Pediatr, Meikai Univ Sch Dent)
P2-39	Morphology of lymphatic vasculature in the craniofacial region of embryonic mice ○Taya Y, Shirako Y, Sato K, Soeno Y (Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)

P2-40	A study on the difference of fusion and merging of facial processes in the maxillofacial morphogenesis of mouse embryos ○Sugiyama A, Takigawa T, Kawano Y (Dept Oral Anat, Div Oral Struct, Funct Dev, Asahi Univ Sch Dent)
P2-41	The effect of constitutive activation of BMP signaling in neural crest cells during craniofacial development ○Toda M, Oka K, Ozaki M (Sect Pediatr Dent, Dept Oral Growth Dev, Fukuoka Dent Coll)
P2-42	Chondroitin sulfate regulates the craniofacial morphogenesis ○Ida-Yonemochi H ¹ , Morita W ² , Shibata S ³ , Ohshima H ¹ (¹ Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent, ² Dept Oral Func Anat, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ³ Div Maxillofac Anat, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P2-43	The contribution of the overlapping layer of ectoderm and endoderm to the developmental initiation of craniofacial organs in rat embryos ○Imai H ¹ , Suzuki R ² (¹ Div Biol, Ohu Univ Sch Dent, ² Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent)
P2-44	Shh signaling during patterning of the murine tongue ○Okuhara S, Iseki S (Div Mol Craniofac Embryol, Tokyo Med and Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P2-45	Analysis of cell cycle related genes, differentiation potential and proliferation in dental pulp stem cell clones ○Kobayashi T, Torii D, Tsutsui T (Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P2-46	Characterization of dental pulp stem cells isolated from a patient diagnosed as Crouzon syndrome ○Torii D, Matsui M, Kobayashi T, Tsutsui T (Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P2-47	The regulatory mechanism of <i>Nestin</i> gene expression in mouse odontoblasts ○Nakatomi M ¹ , Quispe-Salcedo A ² , Ida-Yonemochi H ² , Ohshima H ² (¹ Div Anat, Kyushu Dent Univ, ² Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P2-48	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells are differentiated into chondrocyte-like cells by forming spheroids <i>in vitro</i> ○Nakatsuka M ¹ , Hosoya A ² , Kumabe S ¹ , Tamura I ¹ (¹ Dept Oral Anat, Osaka Dent Univ, ² Dept Oral Histol, Matsumoto Dent Univ)
P2-49	Effect of the functional appliance on the condyle growth in rats ○Jue SS ¹ , Kim JY ² , Owtad P ³ , Park J ³ , Shin JW ¹ (¹ Dept Oral Anat, Sch Dent, Kyung Hee Univ, ² Dept Dent Hygiene, Coll of Health Sci, Gachon Univ)
P2-50	Osteonectin inhibits adipocyte differentiation by suppressing AP-1 transcriptional activity ○Maeda T, Suzuki A, Kato Y (Div Oral Func Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent)
P2-51	Evaluation of the proliferative effect of cuttlefish bone powder on osteoblasts ○Korsuwannawong S (Res Off, Fac Dent, Mahidol Univ)
P2-52	Volume of newly formed microvasculature in interspaces of bone substitute granules ○Toda I, Ohnishi Y, Uemura M, Kawashima W, Takemura A (Dept Anat, Osaka Dent Univ)
P2-53	Beneficial health effects of phytochemicals: Stimulatory effect of petunidin on osteoblast differentiation and mineralization ○Maeda T ¹ , Nagaoka M ² , Suzuki A ¹ , Kato Y ¹ , Suzuki K ² (¹ Div Oral Func Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent, ² Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent)
P2-54	Krüppel-like factor 4 knock out mouse exhibit craniofacial and appendicular skeletal defects ○Fujikawa J ^{1,2} , Nomir A ¹ , Takeuchi Y ¹ , Kito A ^{1,2} , Abe M ¹ , Wakisaka S ¹ (¹ Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent, ² Div Spec Needs Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent)
P2-55	Expression and role of chromogranin A in mesenchymal stem cells ○Sadaoka S ¹ , Yagami K ² , Kawahara I ^{1,2} (¹ Dept Oral Health, Matsumoto Dent Univ, ² Dept Health Promotion Stomatol, Matsumoto Dent Univ Grad Sch Dent)
P2-56	Chronological changes on the localization of FGF23-synthesizing cells in murine bone ○Sakurai A ^{1,2} , Hasegawa T ² , Yamamoto T ² , Sano H ¹ , Amizuka N ² (¹ Dept Restor Dent, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P2-57	Sphingomyelin synthase 2 siRNA regulates osteoblast functions ○Yoshikawa Y, Domae E, Kamada A, Ikeo T (Dept Biochem, Osaka Dent Univ)
P2-58	Effects of transcription factor EB (TFEB) during osteoblast differentiation ○Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Tsukuba T (Dept Dent Pharmacol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci)
P2-59	Effects of Complement C1q on bone remodeling ○Aonuma F ¹ , Higashi S ² , Ohsumi T ² , Hosokawa R ¹ , Takeuchi H ² (¹ Div Oral Reconstr Rehabil, Kyushu Dent Univ, ² Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ)
P2-60	Localization of Sorcin, Ca ²⁺ binding protein, in the bone tissues ○Kawai M, Ohura K (Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ)
P2-61	Mechanisms inducing morphological changes and growth arrest of septoclasts by excess or deficiency of retinoic acids ○Bando Y, Sakashita H, Sakiyama K, Amano O (Div Anat, Meikai Univ Sch Dent)
P2-62	Effects of anti-RANKL antibody on the bone metabolism of young mice ○Karakawa A ¹ , Isawa M ^{1,2} , Kiyohara S ^{1,3} , Sakai N ¹ , Takami M ¹ (¹ Dept Pharmacol, Showa Univ Sch Dent, ² Dept Pediatr Dent, Showa Univ Sch Dent, ³ Dept Implant Dent, Showa Univ Sch Dent)

P2-63	The effect of lack of osteoclasts to the site-specific disappearance style of Meckel's cartilage ○Inoue K (Dept Oral Functional Anat, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P2-64	Nicorandil inhibits osteoclast differentiation <i>in vitro</i> ○Iwaki F, Amano H, Ohura K (Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ)
P2-65	Ultrastructural study of the cell fusion and cytokinesis during osteoclasts formation ○Zhang JQ ¹ , Shiratori T ^{1,2} , Kukita A ³ , Yamaza T ¹ , Kukita T ¹ (¹ Sect Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Sect Implant Rehabil Dent, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ³ Dept Microbiol, Saga Univ Fac Med)
P2-66	The N-terminal fragment of fibronect binds to CD13 of osteoclast progenitor and enhances osteoclastogenesis ○Amano S, Ohmori Y (Dept Oral Biol Tissue Eng, Meikai Univ Sch Dent)
P2-67	Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) gene deletion inhibits osteoclast differentiation via up-regulation of interferon regulatory factor-8 (Irf8) ○Sakai E, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T (Dept Dent Pharmacol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci)
P2-68	Three-dimensional structure and distribution of Golgi complexes in osteoclasts observed by scanning electron microscopy using an osmium-maceration method ○Yamamoto T, Tsuboi K, Hasegawa T, Hongo H, Amizuka N (Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P2-69	Pam ₂ CSK ₄ , a tri-acylated lipopeptide, induces osteoclastogenesis RANK/RANKL-independently and resorbs calvarial bone <i>in vivo</i> through Toll-like receptor 2 ○Suzuki K ^{1,2} , Arimoto T ³ , Nagaoka M ¹ , Kuwata H ³ , Shinoda H ⁴ (¹ Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent, ² Dept Pharmacol, Showa Univ Sch Dent, ³ Dept Oral Microbiol & Immunol, Showa Univ Sch Dent, ⁴ Ctr Environ Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
P2-70	Mechanism of action of CCN2-binding protein CD302 on osteoclast maturation ○Aoyama E ¹ , Kubota S ^{1,2} , Takigawa M ¹ (¹ Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci (ARCOCS) Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, ² Dept Biochem Mol Dent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci)
P2-71	Tumor reduction and bone restoration by TAK-1 inhibition ○Teramachi J, Okamura H, Haneji T (Dept Histol Oral Histol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci)
P2-72	The elucidation of mandibular bone and tooth in severe infantile hypophosphatasia model mouse treated by gene therapy ○Ikeue R ¹ , Takahashi A ² , Sato T ¹ , Kasahara M ² , Muramatsu T ³ (¹ Dept Crown Bridge Prosthodont, Tokyo Dent Coll, ² Dept Pharmacol, Tokyo Dent Coll, ³ Dept Endodont Pulp Periapical Biol, Tokyo Dent Coll)
P2-73	The effect of vitamin C deficiency on the chorda tympani nerve responses to salt and sour tastants ○Yasuo T, Suwabe T, Yamamura T, Sako N (Dept Oral Physiol, Asahi Univ Sch Dent)
P2-74	The expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (GIPR) in mouse taste tissue ○Takai S ¹ , Ninomiya Y ² , Shigemura N ¹ (¹ Sect Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ, ² Div Sensory Physiol, R&D Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu Univ)
P2-75	Pain-associated mediators and gene modulation in acetic acid-induced oral ulcerative mucositis in rats ○Hitomi S, Ono K, Nodai T, Ito M, Inenaga K (Div Physiol, Kyushu Dent Univ)
P2-76	Expression of TRPV1 and TRPM8 channels in the superior laryngeal nerve innervating the laryngeal region ○Ando H ¹ , Masuda Y ² , Kitagawa J ³ (¹ Dept Biol, Matsumoto Dent Univ, ² Dept Oral and Maxillofac Biol, Matsumoto Dent Univ Grad Sch, ³ Dept Oral Physiol, Matsumoto Dent Univ)
P2-77	Sweet taste information via SGLT1 in mouse chorda tympani and glossopharyngeal nerves ○Yasumatsu K ^{1,2} , Iwata S ^{2,3} , Ohkuri T ² , Shigemura N ² , Ninomiya Y ^{1,3} (¹ Div Sensory Physiol, R&D Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu Univ, ² Sect Oral Neurosci, Grad Sch Dent, Kyushu Univ, ³ Monell Chemical Senses Center)
P2-78	ECG, EMG and EEG analysis of the effect of food preference on masticatory muscle activity and neural activity during mastication period ○Honma S ^{1,2} , Wakisaka S ¹ (¹ Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ, Grad Sch Dent, ² Dept Oral Health Sci, BAIKA Women's Univ)
P2-79	Spatiotemporal changes in neuronal excitability in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury ○Terayama R ¹ , Yamamoto Y ^{1,2} , Kishimoto N ^{1,2} , Tabata M ^{1,2} , Maruhama K ¹ , Iida S ² , Sugimoto T ¹ (¹ Dept Oral Funct Anat, Okayama Univ Grad Sch Med, Dent PharmSci, ² Dept Oral and Maxillofac Reconstr Surg, Okayama Univ Grad Sch Med, Dent PharmSci)
P2-80	Bilateral increases in ERK activation at spinomedullary junction region by masseter muscle injury during temporomandibular joint inflammation in the rats ○Okamoto K ¹ , Kurose M ¹ , Nakatani Y ^{1,2} , Hasegawa M ^{1,3} , Fujii N ³ , Takagi R ² , Yamamura K ¹ (¹ Div Oral Physiol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Div Oral Maxillofac Surg, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, ³ Gen Dent Clinic Edu Unit, Niigata Univ Med Dent Hosp)
P2-81	Rhythmic jaw movements induced by repetitive electrical stimulation of the amygdaloid nucleus in the rat ○Satho Y, Ishizuka K, Takahashi M, Iwasaki S (Dept Physiol, Nippon Dent Univ at Niigata)
P2-82	Orexin-A counterbalances the inhibition of reflex swallowing induced by GLP-1 ○Kobashi M, Fujita M, Mitoh Y, Matsuo R (Dept Oral Physiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci)
P2-83	Glutamatergic synaptic inputs to the rat developing trigeminal motoneurons ○Nakamura S, Nakayama K, Mochizuki A, Kiyomoto M, Inoue T (Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent)
P2-84	Changes of insular cortical local circuits in the model rats that receive ablation of unmyelinated primary sensory fibers by capsaicin injection ○Murayama S ^{1,2} , Kobayashi M ² (¹ Dept Endodont, Nihon Univ Sch Dent, ² Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent)

P2-85	Functional connectivity analysis of olfactory system-7 tesla fMRI study ○Fukami H, Sahara Y (Dept Physiol, Iwate Med Univ Sch Dent)
P2-86	Cellular birthdate and distribution pattern in the nucleus of the solitary tract and parabrachial nucleus in rats ○Suwabe T, Yasuo T, Sako N (Dept Oral Physiol, Div Oral Funct Sci Rehabil, Asahi Univ Sch Dent)
P2-87	Temporal signaling patterns of somatosensory neurons in the dorsal column nucleus and trigeminal nucleus in the rat medulla ○Shishido S ^{1,2} , Toda T ¹ (Div Oral Physiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ² Akamori Oriental Medical Coll)
P2-88	Evaluation of prenatal treatments of an environmental endocrine disrupter using pre-weaning rats and a predator odor ○Fujimoto T, Nishikawa Y (Dept Physiol, Osaka Dent Univ)
P2-89	The effects of Citalopram on the modulation of masseter muscle activity during non-REM sleep ○Nogawa Y ¹ , Mochizuki A ² , Kato T ³ , Katayama K ⁴ , Abe Y ⁴ , Nakamura S ² , Nakayama K ² , Baba K ⁴ , Wakabayashi N ¹ , Inoue T ² (Div Removable Partial Prosthodont, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent, ³ Dept Oral Anat Neurobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent, ⁴ Dept Prosthodont Showa Univ Sch Dent)
P2-90	The spatial profiles of cortical excitation induced by mechanical stimulation of the periodontal ligament ○Kaneko M ^{1,2} , Kobayashi M ² , Shimizu N ¹ , Horinuki E ^{1,2} (Dept Orthodont, Nihon Univ Sch Dent, ² Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent)
P2-91	Cerebral blood flow during voluntary lip movements using functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) ○Kurose M ¹ , Okamoto K ¹ , Hasegawa M ^{1,2} , Nakatani Y ^{1,3} , Fujii N ² , Yamada Y ⁴ , Sato Y ⁵ , Yamamura K ¹ , Masuda Y ⁶ (Div Oral Physiol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Gen Dent Clinic Educ Unit, Niigata Univ Med Dent Hosp, ³ Div Oral Maxillofac Surg, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, ⁴ Tokyo Dent Coll, ⁵ Dept Physiol, Nippon Dent Univ at Niigata, ⁶ Dept Oral Maxillofac Biol, Grad Sch Oral Med, Matsumoto Dent Univ)
P2-92	Inhibitory effects of dexamethasone on bite opening-induced hypertrophy in masseter and cardiac muscles ○Umeki D ¹ , Ohnuki Y ² , Ito A ¹ , Yagisawa Y ¹ , Nariyama M ³ , Ishikawa M ⁴ , Kawamura N ⁵ , Nakamura Y ¹ , Okumura S ² (Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ³ Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ⁴ Dept Oral Anat, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ⁵ Dept Periodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P2-93	Muscle repair and distribution of high mobility group box 1 (HMGB1) in the peri-cancerous tissue ○Komine Y ^{1,2} , Sakiyama K ¹ , Takizawa S ² , Bando Y ¹ , Amano O ¹ (Div Anat, Meikai Univ Sch Dent, ² Div Oral Maxillofac Surg, Meikai Univ Sch Dent)
P2-94	MyoD and CDK6 are regulated by miR-29a-Tet1 pathway in the C2C12 myoblast cells ○Ando H (Dept Biophys, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P2-95	Role of microphthalmia-associated transcription factor in masseter muscle hypertrophy induced by β 2-adrenoceptor stimulation ○Nariyama M ¹ , Ohnuki Y ² , Umeki D ³ , Ito A ³ , Kawamura N ⁴ , Yagisawa Y ³ , Okumura S ² , Asada Y ¹ (Dept Pediatr Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ³ Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ⁴ Dept Periodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P2-96	TGF- β 1 induces invasion ability of human oral squamous cell carcinoma cell HSC-4 through the Slug/Wnt-5b/MMP-10 signaling axis ○Kamo M ¹ , Hino M ² , Kyakumoto S ¹ , Ishisaki A ¹ (Div Cell Biosig Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ Sch Dent, ² Div Oral Maxillofac Surg, Dept Reconst Oral Maxillofac Surg, Iwate Med Univ Sch Dent)
P2-97	Keratinization mechanism in keratocystic odontogenic tumor ○Ochiai T ¹ , Nakano K ² , Hasegawa H ¹ (Dept Oral Pathol, Matsumoto Dent Univ, ² Dept Oral Pathol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci)
P2-98	Functional analysis of R2TP in progression of oral squamous cell carcinoma ○Kakihara Y ¹ , Yamazaki M ² , Kiguchi T ¹ , Saeki M ¹ (Div Dent Pharmacol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Div Oral Pathol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P2-99	Signaling pathways for VE-cadherin-dependent vasculogenic mimicry formation by synovial fibroblast-like cells of rheumatoid arthritis ○Yamaguchi K, Sudo H, Imai K (Dept Biochem, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P2-100	Mechanisms involved in enhancement of matrix metalloproteinase-9 expression by interleukin-33 ○Ariyoshi W ¹ , Wichida C ^{1,2} , Okinaga T ¹ , Nishihara T ¹ (Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ, ² Div Pediatr Dent, Kyushu Dent Univ)
P2-101	Tetrahydrobiopterin enhances serotonin biosynthesis in mast cells ○Ohashi A, Kasahara M, Naito M, Takahashi T (Dept Anat, Nihon Univ Sch Dent)
P2-102	Effect of oral pathobionts-induced gut dysbiosis on the NAFLD progression ○Osaka T (Dept Microbiol Immunol, Tokyo Women's Med Univ)
P2-103	Influence of low-energy laser irradiation on nitric oxide and VEGF expression in vascular endothelial cells ○Moro Y, Harada T (Div Oral Radiol Diag, Ohu Univ Sch Dent)
P2-104	The mechanism of dexmedetomidine hydrochloride effects to the vascular permeability of human umbilical vein endothelial cells induced with histamine ○Fukada T ¹ , Toen T ¹ , Hashimoto S ² , Sunada K ³ (Sect Radioisotopes Res, Res Center for Odontol, Sch Life Dent at Tokyo, Nippon Dent Univ, ² Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, ³ Dept Dent Anesthesiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P2-105	MALDI-TOF-MS analysis of gut microbiota in murine model of food allergy ○Kataoka H, Kuwata H (Dept Microbiol Immunol, Showa Univ Sch Dent)

P2-106	Investigation of immune response against periodontal-pathogen <i>Porphyromonas gingivalis</i> ○Nagao J, Narita Y, Tasaki S, Hashimoto M, Ikezaki S, Arita-Morioka K, Cho T, Tanaka Y (Div Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll)
P2-107	Docosahexaenoic acid downregulates inflammasome activity induced by <i>A. actinomycetemcomitans</i> invasion in macrophages ○Okinaga T ¹ , Ariyoshi W ¹ , Usui M ² , Nishihara T ¹ (Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ, ² Div Periodontol, Kyushu Dent Univ)
P2-108	MSCs polarize undifferentiated monocytes/macrophages to the immunosuppressive macrophages in the co-culture of bone marrow cells: implication of cell adhesion ○Kyakumoto S ¹ , Takizawa N ² , Okubo N ³ , Suzuki K ^{1,2} , Chosa N ¹ , Ibi M ⁴ , Kamo M ¹ , Yaegashi T ² , Ishisaki A ¹ (Div Cell Bio-signal Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ, ² Div Periodontol, Sch Dent, Iwate Med Univ, ³ Lab Pathophysiol and Therapeut, Fac Pharma Sci, Hokkaido Univ, ⁴ Dept Mol Cell Pharma, Sch Pharma Sci, Iwate Med Univ)
P2-109	Resistance to IFN of mouse squamous cell carcinoma is due to impaired expression of the interferon-inducible protein p204 (Ifi204) ○Yamaguchi H, Ohmori Y (Div Microbiol Dept Oral Biol Tissue Eng, Meikai Univ Sch Dent)
P2-110	The regulation of expression of GRIM-19 in oral squamous carcinoma cells ○Hiroi M ¹ , Mori K ² , Shimada J ² , Ohmori Y ¹ (Div Microbiol, Meikai Univ Sch Dent, ² Div Oral Maxillofac Surg, Meikai Univ Sch Dent)
P2-111	Antitumor effects of systemic administration with a low dose TLR7/8 agonist and its combined therapy with PD-L1 blockade ○Nishii N ^{1,2} , Tachinami H ¹ , Kondo Y ¹ , Harada H ² , Azuma M ¹ (Div Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, ² Div Oral & Maxillofac Surg, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P2-112	A study on processing of the Mfa4 accessory protein of Mfa1 fimbriae in periodontal pathogen <i>Porphyromonas gingivalis</i> ○Hasegawa Y, Nagano K, Yoshida Y, Yoshimura F (Div Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent)
P2-113	Enzymatic characterization of phosphotransacetylase and acetate kinase associated with biosynthesis of ATP in <i>Porphyromonas gingivalis</i> ○Yoshida Y ¹ , Sato M ^{1,2} , Kezuka Y ³ , Hasegawa Y ¹ , Nagano K ¹ , Yoshimura F ¹ (Div Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, ² Div Partial Denture, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, ³ Dept Structural Biol, Aichi-Gakuin Univ Sch Pharm)
P2-114	Amino acid and oligopeptide transporters in <i>Porphyromonas gingivalis</i> ○Ohara-Nemoto Y, Kobayakawa T, Baba T, Nemoto T (Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci)
P2-115	Preparation of the radiolabeled lipopolysaccharide from <i>Porphyromonas gingivalis</i> ○Toen T ¹ , Hashimoto S ² , Fukada T ¹ , Fujita M ³ , Kuraji R ³ , Ito H ³ , Numabe Y ³ (Sect Radioisotopes Res, Res Center for Odontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, ² Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, ³ Dept Periodontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P2-116	Roles of <i>Porphyromonas gingivalis</i> gingipains to produce volatile sulfur compounds ○Hiramine H ¹ , Watanabe K ² , Kumada H ³ , Hamada N ² (Dept Highly Adv Stomatol, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, ² Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, ³ Dept Dent Educ, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent)
P2-117	Structure and function analyses of succinyl-CoA reductase involving butyrate production in <i>Porphyromonas gingivalis</i> ○Kezuka Y ¹ , Yoshida Y ² (Dept Struct Biol, Iwate Med Univ Sch Pharm, ² Div Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent)
P2-118	Role of the ECF sigma factors in cell wall character in <i>Porphyromonas gingivalis</i> ○Kikuchi Y ^{1,2} , Kokubu E ^{1,2} , Shibayama K ¹ , Ohara N ³ , Nakayama K ⁴ , Ishihara K ^{1,2} (Dept Microbiol, Tokyo Dent Coll, ² Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll, ³ Dept Oral Microbiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, ⁴ Dept Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci)
P2-119	The role of <i>P. gingivalis</i> gingipains on PI3 kinase/Akt signaling pathway ○Nakayama M ^{1,2} , Naito M ³ , Nakayama K ³ , Ohara N ^{1,2} (Dept Oral Microbiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, ² ARCOGS, Okayama Univ Dent Sch, ³ Dept Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci)
P2-120	The effect of <i>Porphyromonas gingivalis</i> H ₂ S synthase on mouse inflammation ○Shioya K ¹ , Hiraoka Y ² , Yoshida A ¹ (Dept Oral Microbiol, Matsumoto Dent Univ, ² Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ)
P2-121	Cell cycle arrest and apoptosis induced by <i>Porphyromonas gingivalis</i> requires JNK and p38 activation in human trophoblasts ○Inaba H ¹ , Amano A ² , Nakano M ¹ (Dept Pediatr, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, ² Dept Prevent Dent Osaka Univ Grad Sch Dent)
P2-122	Characterization of extracellular nucleases from <i>Prevotella intermedia</i> ○Fukamachi H, Morisaki H, Arimoto T, Kataoka H, Kuwata H (Dept Microbiol Immunol, Showa Univ Sch Dent)
P2-123	Identification of small RNA in <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ○Oogai Y, Komatsuzawa H (Dept Oral Microbiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci)
P2-124	Analyses of cariogenic factor genes from <i>Streptococcus ferus</i> ○Shinozaki-Kuwahara N, Saito M, Tsuzukibashi O, Kobayashi R, Hashizume-Takizawa T, Kurita-Ochiai T (Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo)
P2-125	Identification of mutations of <i>Streptococcus sobrinus</i> dextran-binding lectin AB genes ○Tamura H, Yamada A (Div Bioregulatory Pharmacol, Dept Pharmacol, Iwate Med Univ)
P2-126	<i>Streptococcus oralis</i> induces lysosomal impairment of macrophages via bacterial hydrogen peroxide ○Okahashi N ¹ , Nakata M ² , Kuwata H ³ , Kawabata S ² (Cent Frontier Oral Sci Osaka Univ Grad Sch Dent, ² Dept Oral Microbiol Osaka Univ Grad Sch Dent, ³ Dept Microbiol Immunol Showa Univ Sch Dent)
P2-127	Pneumococcal adaptation to environmental temperature shift impacts survival in blood ○Nakata M, Sumitomo T, Yamaguchi M, Kawabata S (Dept Oral Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent)

P2-128	<i>Streptococcus pneumoniae</i> supernatants may contribute to influenza A virus infection ○Kamio N, Ochiai K, Imai K (Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent)
P2-129	Isolation and identification methods of oral predominant <i>Actinomyces</i> species ○Uchibori S ¹ , Tsuzukibashi O ² , Kobayashi T ¹ , Aida M ¹ (Dept Crown Bridge Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, ² Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo)
P2-130	A novel selective medium for the isolation and distribution of <i>Actinomyces israelii</i> ○Tsuzukibashi O ¹ , Uchibori S ² , Saito M ¹ , Kobayashi R ¹ , Takizawa T ¹ , Shinozaki-Kuwahara N ¹ , Ochiai T ¹ (Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, ² Dept Crown Bridge Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo)
P2-131	<i>Propionibacterium gingivaerubrum</i> sp. nov., a red-pigmented species isolated from human gingival sulcus ○Saito M, Kuwahara N, Tsuzukibashi O, Takizawa T, Kobayashi R, Ochiai T (Dept Microbiol, Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo)
P2-132	Variations of nitrate-reducing activity in <i>Rothia</i> spp. ○Mashimo C, Maruyama Y, Yamanaka T, Yamane K, Oh H, Nambu T (Dept Bacteriol, Osaka Dent Univ)
P2-133	The cariogenic potential of oral <i>Bifidobacterium</i> in terms of carbohydrate metabolism ○Abiko Y ^{1,2} , Sugahara A ³ , Murakami K ³ , Kawashima J ⁴ , Takahashi N ¹ (Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ² Liaison Center Innovative Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent, ³ 6th grade, Tohoku Univ Sch Dent, ⁴ TooMo, Tohoku Univ)
P2-134	A high sensitive fluorescence-mediated assessment of the metabolic activity of oral plaque biofilm ○Washio J, Ishiguro K, Irie D, Uchiyama A, Takahashi N (Div Oral Ecol Biochem, Tohoku Univ Grad Sch Dent)
P2-135	Effect of periodontopathic bacteria on teeth discoloration ○Imai A ^{1,3} , Matsuda K ² (Dept Dent Hygiene, Nippon Dent Univ Coll at Niigata, ² Dept Pediatr Dent, Nippon Dent Univ at Niigata, ³ Dept Biochem, Nippon Dent Univ at Niigata)
P2-136	Identification of periodontal pathogen's components inducing T cell response ○Narita Y, Nagao J, Tasaki S, Arita-Morioka K, Hashimoto M, Ikezaki S, Cho T, Tanaka Y (Div Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll)
P2-137	Research in candidate foods with bactericidal activity against periodontopathic bacteria ○Nakao R, Senpuku H (Dept Bacteriol I, Natl Inst Infect Dis)
P2-138	Inhibitory mechanism of odor by metal ions ○Taniguchi N ¹ , Nakano Y ² , Kuwata F ² , Hanioka T ¹ (Dept Prev Public Health Dent, Fukuoka Dent Coll, ² Dept Chem, Nihon Univ Sch Dent)
P2-139	Inhibitory effects of French pine bark extract on dental plaque formation ○Watanabe K ¹ , Hiramine H ² , Toyama T ¹ , Sasaki H ¹ , Hamada N ¹ (Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, ² Dept Highly Adv Stomatol, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent)
P2-140	Evaluation of structure-activity relationships in penetration of terpene compound into the preformed biofilm ○Fujita M ¹ , Osada K ² , Miyakawa H ¹ , Nakazawa F ¹ (Div Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido, Sch Dent, ² Div Physiol, Health Sci Univ Hokkaido, Sch Dent)
P2-141	Inhibitory effect of allyl isothiocyanate against <i>Candida albicans</i> ○Tamura M ^{1,2} , Ochiai K ¹ , Imai K ^{1,2} (Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent, ² Div Immunol Pathobiol Res Cent, Nihon Univ Sch Dent)
P2-142	Survey on oral carriage of genus <i>Candida</i> in young healthy students and the antifungal susceptibility of the isolates – Part 2 ○Fukui K ¹ , Imai A ^{2,3} , Kuwashima H ¹ , Nakamura K ¹ (Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ at Niigata, ² Dept Biochem, Nippon Dent Univ at Niigata, ³ Dept Dent Hygiene, Nippon Dent Univ Coll at Niigata)
P2-143	Analysis of <i>Candida albicans</i> derived molecules recognized by T cells ○Cho T, Tasaki S, Nagao J, Narita Y, Hashimoto M, Ikezaki S, Arita-Morioka K, Tanaka Y (Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll)
P2-144	Differences in IL-1 β production-inducing activity of <i>Candida albicans</i> toward dendritic cells and macrophages ○Hasebe A ¹ , Saeki A ¹ , Kamezaki R ^{1,2} , Shibata K ¹ (Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Dept Oral Diagn Med, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P2-145	TRAF6-regulated basal autophagy prevents autoactivation of proinflammatory signaling initiated through intracellular accumulation of MyD88 ○Into T, Horie T, Inomata M, Murakami Y (Dept Oral Microbiol, Div Oral Infect Health Sci, Asahi Univ Sch Dent)
P2-146	Identification of regulatory factors of angiogenic blood vessel growth in tooth germ ○Sunohara M, Seki S, Sato I (Dept Anat, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P2-147	Identify of binding region of Smad4 and NF- κ B/p65 ○Urata M ^{1,2} , Matsubara T ¹ , Takeuchi H ³ , Nakatomi C ¹ , Hirata-Tsuchiya S ⁴ , Kokabu S ¹ , Chou B ⁵ , Kitamura C ² , Jimi E ¹ (Div Mol Signal Biochem, Kyushu Dent Univ, ² Div Endodont Restorative Dent, Kyushu Dent Univ, ³ Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ, ⁴ Dept Biol Endod, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci, ⁵ Div Pathol, Kyushu Dent Univ)
P2-148	Involvement of phospholipase C-related, but catalytically inactive protein (PRIP) in ovarian function ○Matsuda M, Hirata M (Sect Mol Cell Biochem, Kyushu Univ Grad Sch Dent)
P2-149	Regulation of SNARE complex formation and exocytosis by phosphorylation of SNAP-25 in PC12 cells ○Gao J ¹ , Hirata M ¹ , Mizokami A ¹ , Takeuchi H ² , Hirata M ¹ (Sect Mol Cell Biochem, Kyushu Univ Grad Sch Dent, ² Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ)
P2-150	Fluorescence bioimaging of intracellular dynamics of the clock proteins ○Nishide S (Dept Cell Physiol, Hokkaido Univ Grad Sch Med)

P2-151	Hydrogen phosphate ion increases the uptake of bisphosphonate into osteoblastic cells ○Tajima M, Sakagami H (Div Pharmacol, Dept Diagn Ther Sci, Meikai Univ Sch Dent)
P2-152	Search for substances that alleviate the toxicity of doxorubicin against human oral keratinocyte ○Sakagami H ¹ , Okudaira N ¹ , Amano O ² , Yokose S ³ (¹ Div Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent, ² Div Anat, Meikai Univ Sch Dent, ³ Div Endod, Meikai Univ Sch Dent)
P2-153	Analyzed aspirin induced differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human periodontal ligament cells (hPDLs) ○Tsutsumi T ¹ , Kobayashi T ¹ , Torii D ¹ , Matsui M ¹ , Nakahara T ² (¹ Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, ² Dept Dev Reg Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo)
P2-154	Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osteoblastic differentiation ○Matsuyama A ^{1,2} , Higashi S ² , Ohsumi T ² , Morotomi T ¹ , Washio A ¹ , Kitamura C ¹ , Takeuchi H ² (¹ Div Endodont Restorative Dent, Kyushu Dent Univ, ² Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ)
P2-155	Effects of ZD0947, a novel and potent ATP-sensitive K ⁺ channel opener, on smooth muscle-type ATP-sensitive K ⁺ channels ○Mori K, Aijima R, Danjo A, Yamashita Y (Dept Oral and Maxillofac Surg, Fac Med, Saga Univ)
P2-156	Inhibition of growth in fibroblasts isolated from patients with gingival overgrowth using 18-alpha-glycyrrhetic acid ○Takeuchi R ¹ , Matsumoto H ² , Hiratsuka K ¹ (¹ Dept Biochem Mol Biol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, ² Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo)
P2-157	Mg, Ca and Zn could promote human bone type alkaline phosphatase activity independently ○Hanya J, Suzuki K, Minamikawa H, Yoshimura Y (Dept Mol Cell Pharmacol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P2-158	Transcriptional regulation of gene encoding D-dopachrome tautomerase in differentiated adipocytes ○Iwata T ¹ , Kuribayashi K ² , Yoshimoto K ¹ (¹ Dept Med Pharmacol, Tokushima Univ Grad Sch Inst Biomed Sci, ² Dept Oral Maxillofac Surg, Dokkyo Med Univ Sch Med)
P2-159	Difficulties in personal identification means of the dental records ○Kasahara N, Nakamura Y, Nagamine F, Hashimoto M (Dept Forensic Odontol Anthropol, Tokyo Dent Coll)
P2-160	DNA analysis of cells transferred from the small amount of sample ○Maruyama S ^{1,2} , Tsutsumi H ^{1,2} , Izawa H ^{1,2} , Komuro T ^{1,2} (¹ Dept Leg Med, Nihon Univ Sch Dent, ² Div Social Dent, Dent Res Center, Nihon Univ Sch Dent)
P2-161	Simultaneous analysis of ABO blood genotype, mtDNA and HaloPlex hereditary arrhythmia-related heart trouble research panel using the SureSelect system ○Tsutsumi H ^{1,2} , Maruyama S ^{1,2} , Izawa H ^{1,2} , Komuro T ^{1,2} (¹ Dept Leg Med, Nihon Univ Sch Dent, ² Div Soc Dent, Dent Res Center, Nihon Univ Sch Dent)
P2-162	Effects of addition of thickening agent on masticatory behavior and physical properties of food bolus ○Shiozawa K, Okumura S (Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med)
P2-163	Morphology and analytical studies on the incremental lines which are observed in the otolith fossils of fishes ○Mishima H ¹ , Kondo Y ² , Miake Y ³ (¹ Dent Hygiene, Dept Med Hygiene, Kochi Gakuen Coll, ² Fac Sci, Kochi Univ, ³ Dept Histol Dev Biol, Tokyo Dent Coll)
P2-164	The role of sodium in the formation of mandibular molars and bone ○Inui-Yamamoto C ¹ , Ueda K ² , Nakatsuka M ² , Matsuda Y ² , Kumabe S ² , Wakisaka S ¹ (¹ Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent, ² Dept Oral Anat, Osaka Dent Univ)
P2-165	Histone methyltransferase G9a is required for proper tendon formation ○Wada S ¹ , Ideno H ² , Shimada A ² , Kamiunten T ¹ , Nakamura Y ¹ , Nakashima K ² , Kimura H ³ , Shinkai Y ⁴ , Tachibana M ⁵ , Nifuji A ² (¹ Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ² Dept Pharmacol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, ³ Sch and Grad Sch Biosci and Biotechnol, Tokyo Inst of Technol, ⁴ Cellular Memory Laboratory, RIKEN, ⁵ Inst of Enzyme Res, Tokushima Univ)
P2-166	Cytocompatibility of nano-sized ceramics particles on several cells ○Seitoku E ¹ , Abe S ² (¹ Dept Restor Dent, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, ² Dept Biomater Bioengin, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med)
P2-167	Age-related decline in biological rhythms ○Takasu N ^{1,2} , Kusano S ^{1,3} , Nakanishi Y ^{1,3} , Nakamura W ¹ (¹ Lab Oral Chronobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent, ² JSPS (RPD), ³ Dept Dent, Osaka Univ)

演者索引

○筆頭演者, ●モリタ賞応募者のうち口演希望者

PL: ロッテ基金特別講演, FS: ロッテ基金特別シンポジウム, L: ライオン学術賞, Y: 歯科基礎医学会奨励賞,

MS: メインシンポジウム, CS: 日本学会会議シンポジウム, KS: 歯科基礎医学会学術シンポジウム,

LS: ランチョンセミナー, SS: サテライトシンポジウム, O: 一般口演, P: ポスター

A

Adhikari Bhoj Raj ○P1-126, P1-127
Amaral Juan O2-C12, P1-23
Anne Tanner MSB-2
Aurelerien Kerever KS-3

B

Batbold Dulguun ●O2-D9, P1-59
Bhawal Ujjal ○O2-C8
Bragiel Aneta ○O2-C4
Bruce J. Baum ○FS-1, ○SS13-1

C

Chaweewannakorn Wichida
○P1-33, P2-100
Christine Kressirer ○MSB-2
Citra Fragrantia Theodorea
MSB-3

D

Darius Mahboubi KS-1
de Vega Susana O2-C12, P1-23

E

Exterkate R.A.M. O1-C14

F

Forcinito Patricia O2-C12, P1-23
Futoshi Nakazawa MSB-3

G

Geneva Williams O2-D17
Gordon Ramage ○MSB-4

H

Haruka Sasaki SS7-3
Hasan Riasat ○P1-72
Hiroshi Miyakawa MSB-3
Hiroshi Takayanagi SS7-5
Hirunwidchayarat Worawalun
●O1-C4, ○P1-112
Hu Jimmy O1-D16

I

Ian A Wilson SS7-4
Izumi Mashima ○MSB-3

K

Kang Siwen O1-C4, P1-112
Keiko Sato SS7-4
Kim Ji-Youn P2-49
Kiyoko Watanabe SS7-3
Klein Ophir O1-D16
Koji Nakayama SS7-1, SS7-4
Koki Shioya SS7-2

M

Mariko Naito SS7-4
Masayuki Tsukasaki SS7-5
Matthew P Hoffman SS13-2
Mikio Shoji ○SS7-4

N

Naradasu Divya P1-42
 Nattakarn Hosiriluck P2-33
 Neopane P P1-126
 Niken Adiba Nadya ●O1-C5, P1-41
 Nobuhiro Takahashi ○MSB-1
 Nobushiro Hamada SS7-3
 Nomir Ahmed ○P2-5, P2-54
 Noriko Komatsu SS7-5

O

Owtad Payam P2-49

P

Park Jae Hyun P2-49
 Prabha Nepal SS4-3
 Pieczonka Tomasz O2-C4

Q

Quispe-Salcedo Angela P2-47

R

Roberto Weigert SS13-3
 Rodrigez Ignacio O2-C12, P1-23

S

Sarper Safiye ●O1-D14, ●O1-D24,
 O2-C1, P1-1, ○P1-65,
 ○P1-66
 Satoshi Shibata SS7-4
 Shin Je-Won P2-49
 Suwanna Korsuwannawong
 P2-51

T

Theodorea Citra ●O2-C25, O2-C26,
 P1-105, P1-108

Tomoki Nakashima SS7-5

W

Wang Qi ●O1-D25, ○P1-69
 Wenyi Wei KS-5

X

Xu Qingping SS7-4

あ

合島 怜央奈 Aijima R SS6-3, ●O1-C25, P1-4,
 P1-78, ○P1-120, P2-155
 會田 雅啓 Aida M P2-129
 青木 和広 Aoki K O2-D20, P1-140
 青木 孝文 Aoki T SS11-4
 青沼 史子 Aonuma F ○P2-59
 青山 絵理子 Aoyama E ○P2-70
 青山 剛三 Aoyama G O1-D24, P1-65
 赤池 孝章 Akaike T ○SS8-1
 赤澤 敏之 Akazawa T SS1-5
 赤松 徹也 Akamatsu T ○P2-27, PS-4
 吾郷 由希夫 Ago Y SS3-4
 朝川 美加李 Asakawa M O1-C13, ○P1-110,
 P1-111
 朝田 芳信 Asada Y P1-30, P1-32, P2-95
 浅見 瑠璃 Asami R ○O2-C17, O2-19
 東 俊文 Azuma T P1-39, O1-C4, O1-C5,
 P1-41, P2-111, P1-112
 東 みゆき Azuma M ○CS-3, O1-C4, O1-C5,
 P1-41, P2-112
 我妻 由梨 Azuma Y ○P1-10, P2-3
 安達 一典 Adachi K ○SS6-1, P1-55, P1-137
 足立 圭亮 Adachi K ○P1-75
 安彦 善裕 Abiko Y P1-126, P1-127
 安彦 友希 Abiko Y P1-91, ○P2-133
 阿部 薫明 Abe S P2-166
 阿部 伸一 Abe S O1-C21, ○O2-C15,
 P1-2, P1-3
 安部 佐 Abe T ○P1-107
 阿部 真土 Abe M P2-5, P2-54
 安部 みさき Abe M P1-125

稲垣 慶則 Inagaki Y P1-12, ○P1-15
 稲葉 裕明 Inaba H ○P2-121
 乾 千珠子 Inui-Yamamoto C ○P2-164
 犬塚 博之 Inuzuka H ○KS-5
 稲永 清敏 Inenaga K P1-56, P1-57, P2-75
 井上 貴一郎 Inoue K P2-31, ○P2-63
 井上 孝二 Inoue K O2-C11
 井上 富雄 Inoue T ○SS15-2, O2-D5,
 P1-52, P2-83, P2-89
 井上 博 Inoue H ○P2-21
 井上 誠 Inoue M ○SS15-1
 猪俣 恵 Inomata M P2-145
 衣斐 美歩 Ibi M P2-108
 今井 あかね Imai A O2-C3, P1-11, ○P2-135,
 P2-142
 今井 一志 Imai K P2-99
 今井 健一 Imai K P2-128, P2-141
 今井 元 Imai H ○P2-43
 今里 聡 Imasato S O1-D14, P1-66
 今村 泰弘 Imamura Y ○P2-35
 入江 一元 Irie K P1-72
 入江 大貴 Irie D P2-134
 岩井 治樹 Iwai H MSD-3, SS15-4,
 ○O2-D10, P1-73, P1-81,
 PS-1
 岩城 太 Iwaki F ○P2-64
 岩崎 信一 Iwasaki S P2-81
 岩瀬 博太郎 Iwase H SS11-2
 岩田 采奈 Iwata A PS-5
 岩田 幸一 Iwata K ○CS-5, SS4-1, SS9-4,
 ○SS15-5, O2-D1,
 O2-D2, O2-D9, P1-49,
 P1-54, P1-59, P1-63
 岩田 武男 Iwata T ○P2-158
 岩田 周介 Iwata S P2-77
 岩槻 健 Iwatsuki K ○SS14-1
 岩永 賢二郎 Iwanaga K P1-133
 岩永 敏彦 Iwanaga T O1-C1, P1-7
 岩山 智明 Iwayama T ○SS10-3, SS16-3
 岩脇 淳志 Iwawaki A O2-C17, ○O2-C19
 引頭 毅 Into T ○P2-145

う

上北 広樹 Uekita H P2-31
 上田 甲寅 Ueda K P2-164
 上原 俊介 Uehara S ○O2-D24
 上原 智己 Uehara T ●O2-D20, ○P1-140
 上原 範久 Uehara N O1-D20, O1-D23,
 O2-D25, O2-D26, P1-6,
 P1-70
 植原 治 Uehara O P1-126, P1-127
 上村 守 Uemura M P2-52
 氏家 優子 Ujiie Y O2-D12, P1-60
 牛島 夏未 Ushijima N P2-13
 臼井 通彦 Usui M P2-107
 宇田川 信之 Udagawa N O2-D24, P1-35, PS-10
 内田 仁司 Uchida H ○SS13-5
 内堀 聡史 Uchibori S ○P2-129, P2-130
 内山 敏一 Uchiyama T O2-C8
 内山 愛理 Uchiyama A P2-134
 宇津木 千鶴 Utsugi C SS14-3
 梅木 大輔 Umeki D O2-D12, O2-D13,
 O2-D14, P1-60, ○P2-92,
 P2-95
 梅村 直己 Umemura N P1-12, P1-14, P1-15,
 P1-16, P1-18, P1-21,
 P1-24, P1-27
 浦田 真梨子 Urata M O1-C16, ○P2-147

え

榮樂 奈保子 Eiraku N O2-D19
 江草 宏 Egusa H SS3-3
 江尻 貞一 Ejiri S P2-2
 榎本 早希子 Enomoto S SS2-2
 海老原 達彦 Ebihara T MSA-4
 遠藤 康男 Endo Y O1-C2

お

王 婧 Wang J SS4-3
 王 宝禮 Wang P O1-C11, P2-35, P2-132
 大井田 新一郎 Oida S P1-29, P1-30, P1-36,
 P2-8, PS-8
 大浦 清 Ohura K P2-60, P2-64

大貝 悠一 Oogai Y	○P2-123		
大木 誠 Ooki M	○P1-61	小方 頼昌 Ogata Y	○SS16-2
大城 希美子 Ohgi K	○P2-14	岡野 栄之 Okano H	○PL-1
大久保 直登 Okubo N	P2-108	岡信 愛 Okanobu A	○P1-129
大久保 水羽 Okubo M	○P1-29	岡橋 暢夫 Okahashi N	○P2-126
大倉 華雪 Okura H	SS16-3	岡部 幸司 Okabe K	○MSC-3, SS4-2, O1-D3, O1-D12, P1-46, P2-14, P2-16
大栗 弾宏 Ohkuri T	P2-77		○O2-D15, O2-D18, P2-71
大坂 利文 Osaka T	○P2-102	岡村 裕彦 Okamura H	P2-15
大澤 賢次 Osawa K	Y-2	岡村 友玄 Okamura T	P1-42
大崎 康吉 Ohsaki Y	O1-C25, P1-4, P1-120	岡本 章玄 Okamoto A	P1-48, ○P2-80, P2-91
大島 朋子 Ohshima T	P1-113	岡本 圭一郎 Okamoto K	○P2-58, P2-67
大島 勇人 Ohshima H	MSC-4, ○LS-1, P1-76, P2-42, P2-47	岡元 邦彰 Okamoto K	MSC-3, SS4-2, O1-D12, P1-46, P2-14
	SS2-3	岡本 富士雄 Okamoto F	SS2-1
大嶋 佑介 Ohshima Y	P1-115	岡山 聡子 Okayama S	P2-33
大須賀 直人 Osuga N	P2-32	岡山 三紀 Okayama M	●O2-C21, O2-C22, ○P1-89
大須賀 謙二 Ohsuga K	○P1-47	小川 真理子 Ogawa M	○P1-3
大杉 侑子 Ohsugi Y	P2-154, P2-59		O1-D18, P1-38
大住 伴子 Ohsumi T	SS2-1	小川 雄大 Ogawa Y	P1-49
太田 啓介 Ohta K	O2-C17, O2-C19	興地 隆史 Okiji T	O1-C8, P1-33, P1-40, P1-95, P2-100, P1-101, P1-133, ○P2-107
大高 祐聖 Otaka Y	○O1-D19, PS-13	小木曾 文内 Ogiso B	MSA-4
大谷 憲司 Otani K	P1-86	沖永 敏則 Okinaga T	P2-152
大谷 崇仁 Ohtani T	○P1-82		P2-17, ○P2-18
大谷 友加里 Ootani Y	MSC-4, ○O1-D13, O1-D17	奥田 賢一 Okuda K	SS1-6, ○O1-C23
大津 圭史 Otsu K	○P1-95	奥平 准之 Okudaiwa N	○P1-16
	Y-2	奥寺 俊允 Okudera T	○P2-44
大塚 麻衣 Otsuka M	O2-D19, O2-D21, P1-20	奥寺 元 Okudera H	○SS12-1
大手 聡 Ohte S	P2-52	奥野 公巳郎 Okuno K	O2-D12, O2-D13, O2-D14, P1-60, P2-92, P2-95, P2-162
大西 智和 Ohnishi T	O2-D12, ○O2-D13, O2-D14, P1-60, P2-92, P2-95	奥原 滋 Okuhara S	O2-D3, P1-50
大西 吉之 Ohnishi Y	O1-C4, P1-112	奥村 哲 Okumura S	P1-92
大貫 芳樹 Ohnuki Y	SS4-3	奥村 敏 Okumura S	○SS14-5, P2-140
	O1-C18, ○P2-101		P1-100
大野 建州 Ohno T	○SS11-1	小倉 一宏 Ogura K	O1-D17, P2-41
大場 雄介 Ohba Y	P2-118, P2-119	小倉 直美 Ogura N	O1-D6, P1-121
大橋 晶子 Ohashi A	P2-66, P2-109, P2-110,	長田 和実 Osada K	P1-52
大林 由美子 Ohbayashi Y	SS6-3	尾崎 和美 Ozaki K	P1-103
大原 直也 Ohara N	O1-D15	尾崎 正雄 Ozaki M	
大森 喜弘 Ohmori Y	MSC-3, ○O1-D17, P2-41	小澤 重幸 Ozawa S	
大山 順子 Oyama J	P1-82	尾関 雅彦 Ozeki M	
岡 俊哉 Oka S	MSC-3, SS4-2, O1-D12,	小田 真隆 Oda M	
岡 暁子 Oka K			
岡田 裕之 Okada H			
緒方 佳代子 Ogata K			

尾台-井出 令奈 Odai-Ide R

○P1-55

小高 研人 Odaka K

O1-C21, P1-3

越智 守生 Ochi M

○SS1-4

落合 智子 Kurita-Ochiai T

P2-124, P2-130, P2-131

落合 邦康 Ochiai K

P2-128, P2-141

落合 隆永 Ochiai T

○P2-97

小野 堅太郎 Ono K

P1-56, P1-57, P2-75

小野 岳人 Ono T

P1-45, P1-68

小野 卓史 Ono T

○MSD-2, P1-45

小野 瞳 Ono H

●O2-C1, ●O2-C6,
○P1-1, P1-83, ○P1-141

小野寺 晶子 Onodera S

P1-39

か

柿原 嘉人 Kakihara Y

○P2-98

影山 伸哉 Kageyama S

●O1-C13, P1-110,
○P1-111

笠原 典夫 Kasahara N

○P2-159

笠原 正彰 Kasahara M

O1-C18, P2-101

笠原 正貴 Kasahara M

P1-130, P1-135, P2-72

梶 佳織 Kaji K

○SS4-1, SS9-4

柏俣 正典 Kashimata M

SS13-2, P1-75, P2-24

柏柳 誠 Kashiyanagi M

○SS14-3

鍛冶屋 浩 Kajiya H

MSC-3, SS4-2, O1-D12,
P1-46, P2-14, P2-16

加治屋 幹人 Kajiya M

O1-D22, P1-129

梶原 景正 Kajiwara K

○O1-C17

片岡 真司 Kataoka S

PS-9

片岡 嗣雄 Kataoka H

○P2-105, P2-122

片桐 綾乃 Katagiri A

SS15-5

片桐 文彦 Katagiri F

KS-2

片桐 岳信 Katagiri T

Y-2, P1-43

片山 慶祐 Katayama K

P2-89

加地 博一 Kachi H

O1-C12, P1-88

勝村 聖子 Katsumura S

○SS11-3

葛城 啓彰 Katsuragi H

PS-3

加藤 治 Katsumata-Kato O

P2-28, ○P2-37

加藤 隆史 Kato T

SS15-3, O2-D6, P2-89

加藤 哲男 Kato T

O2-C3, P1-11

加藤 展教 Kato H

P1-134

加藤 美咲 Kato M

○PS-13

加藤 靖正 Kato Y

P2-50, P2-53

金澤 知之進 Kanazawa T

SS2-1

金子 純也 Kaneko J

○O1-C8

金子 直樹 Kaneko N

○P1-117, P1-123

金子 茉莉 Kaneko M

○P2-90

兼松 隆 Kanematsu T

O2-D7

鎌田 愛子 Kamada A

O1-C6, P2-57

上運天 太一 Kamiunten T

○P1-84, P2-165

神尾 宜昌 Kamio N

○P2-128

上岡 寛 Kamioka H

SS2-3

上條 竜太郎 Kamijo R

P1-34, P1-44

神谷 真子 Kamiya M

P1-12, P1-14, P1-15,
P1-16, P1-18, P1-21,
P1-24, P1-27

亀崎 良助 Kamezaki R

O1-C9, P1-102,
○P1-104, P2-144

加茂 政晴 Kamo M

P1-13, ○P2-96, P2-108

鴨頭 奈央子 Kamogashira N

○P2-22

唐川 亜希子 Karakawa A

○P2-62

唐木田 丈夫 Karakida T

P1-32, ○P2-8

河井 智美 Kawai T

P1-113

川合 宏仁 Kawai H

P2-32

河井 まりこ Kawai M

○P2-60

河合 遼子 Kawai R

P1-118

川上 敏行 Kawakami T

P1-115

川木 晴美 Kawaki H

P1-12, P1-14, P1-15,
P1-16, P1-18, P1-21,
P1-24, P1-27

川久保-安河内 友世 Kawakubo-Yasukochi T

O1-D1, O1-D9, O2-C9,
P1-19, P1-116

川嶋 順子 Kawashima J

P1-91, P2-133

川島 伸之 Kawashima N

○O1-D18, P1-38

川島 涉 Kawashima W

P2-52

河田 亮 Kawata A

O1-C14

川田 正晃 Kawata M

MSA-4

川野 亜希 Kawano A

○P1-101

河野 英輔 Kawano E

P2-12

川野 真太郎 Kawano S

P1-117, P1-123

河野 哲 Kawano S

P1-16

河野 芳朗 Kawano Y

P2-40

川端 重忠 Kawabata S

O2-C20, O2-C21,
O2-C22, P1-89, P1-98,
P2-126, P2-127

川原 一郎 Kawahara I

P2-55

川邊 好弘 Kawabe Y
 川村 直矢 Kawamura N

 川本 真一郎 Kawamoto S
 川元 龍夫 Kawamoto T
 河原井 武人 Kawarai T
 韓 雪 Han X
 姜 晴 Jiang Q
 姜 英男 Kan Y
 菅崎 弘幸 Kanzaki H

P1-8
 ●O2-D12, O2-D13,
 O2-D14, ○P1-60, P2-92,
 P2-95
 ○SS2-5
 P1-56
 P1-107
 P1-80
 ○P1-64
 SS9-2
 P1-67

清本 聖文 Kiyomoto M

SS15-2, O2-D5, P1-52,
 P2-83



久木田 明子 Kukita A

O2-D25, O2-D26, P1-6,
 P1-70, P2-65

久木田 敏夫 Kukita T

O1-D20, O1-D21,
 O1-D23, O2-C14,
 O2-D25, O2-D26, P1-6,
 P1-70, P1-74, P2-65

草野 慎之介 Kusano S

P2-167, PS-11, ○PS-12

楠川 仁悟 Kusukawa J

SS2-1

楠田 優一郎 Kusuda Y

SS13-4, P1-53

楠山 讓二 Kusuyama J

○SS12-3, O2-D19,
 ●O2-D21, ○P1-20

工藤 保誠 Kudo Y

O1-D5, P1-122

久保 勝俊 Kubo K

P1-118

久保木 芳徳 Kuboki Y

SS1-1, SS1-2, SS1-7

久保田 聡 Kubota S

O2-C7, O2-D22, P2-70

熊田 秀文 Kumada H

P2-116

隈部 俊二 Kumabe S

P2-48, P2-164

倉治 竜太郎 Kuraji R

P2-115

倉谷 顕子 Kuratani A

O1-D1, P1-19

倉本 恵梨子 Kuramoto E

○MSD-3, SS15-4,
 O2-D10, P1-73, P1-81,
 PS-1

栗林 恭子 Kuribayashi K

P2-158

栗原 琴二 Kurihara K

○P2-29

栗原 英見 Kurihara H

○CS-2, O1-D22,
 P1-129

栗本 聖之 Kurimoto T

SS10-2

黒石 加代子 Kuroishi K

P1-56

黒石 智誠 Kuroishi T

○O1-C2

黒坂 寛 Kurosaka H

O1-D24, O1-D25, P1-65,
 P1-69

黒澤 美絵 Kurosawa M

○P1-103

黒瀬 雅之 Kurose M

P1-48, P2-80, ○P2-91

桑島 治博 Kuwashima H

P2-142

桑田 啓貴 Kuwata H

P2-69, P2-105, P2-122,
 P2-126,

桑田 文幸 Kuwata F

P2-138

桑原 紀子 Shinozaki-Kuwahara N

○P2-124, P2-130,

き

菊池 章 Kikuchi A
 菊池 毅 Kikuchi T
 菊池 有一郎 Kikuchi Y
 木口 哲郎 Kiguchi T
 岸本 宜子 Kishimoto N
 北川 純一 Kitagawa J
 北河 憲雄 Kitagawa N
 北川 道憲 Kitagawa M
 北川 善政 Kitagawa Y
 北村 啓 Kitamura K
 北村 淳 Kitamura J
 北村 清一郎 Kitamura S
 北村 知昭 Kitamura C
 北村 正博 Kitamura M
 吉川 美弘 Kikkawa Y
 城戸 瑞穂 Kido M

 鬼頭 昭吉 Kito A
 木部 琴乃 Kibe K
 木村 俊介 Kimura S
 木村 重信 Kimura S
 木村 宏 Kimura H
 木村 麻記 Kimura M
 客本 斉子 Kyakumoto S
 久本 由香里 Kyumoto Y

 清島 保 Kiyoshima T

 清原 秀一 Kiyohara S

SS10-2
 SS16-1
 P1-96, ○P2-118
 P2-98
 P2-79
 P2-76
 ○P1-86
 ○P2-23
 P1-104
 O2-C15, P1-2
 P1-26, ○P1-37
 O2-C16
 P1-95, P2-147, P2-154
 SS16-3
 O1-C6, ○P2-57
 ○SS6-3, O1-C25, P1-4,
 P1-78, P1-120
 P2-54
 ○PS-9
 ○O1-C1, P1-7
 P1-114
 P1-84, P2-165
 O2-D3, ○P1-50, P2-7
 P1-13, P2-96, ○P2-108
 O1-D20, O1-D23,
 O2-D25, ●O2-D26,
 ○P1-6, P1-70
 O1-C25, P1-4, P1-120,
 P1-125
 P2-62

	P2-131
郡司掛 香織 Gunjigake K	P1-56
け	
毛塚 雄一郎 Kezuka Y	P2-113, ○P2-117
こ	
小出 雅則 Koide M	P1-35
高 靖 Gao J	○P2-149
光 夢凱 Guang M	○O1-C24
合田 征司 Goda S	O1-C6, P2-21
河野 恭佑 Kono K	O2-D3, P1-50
河野 哲朗 Kono T	P1-82
古株 彰一郎 Kokabu S	Y-2, O1-C16, ○O2-D11, O2-D23, P2-147
国分 栄仁 Kokubu E	P1-96, P2-118
越川 憲明 Koshikawa N	O2-D8, P1-51
小島 寛 Kojima H	P1-99
小島 佑貴 Kojima Y	O2-D3, P1-50, P2-7
小島 由佳子 Kojima Y	○P1-113
古玉 芳豊 Kodama Y	P1-114
後藤 花奈 Goto K	O2-C20, P1-98
後藤 加寿子 Goto K	○P2-16
後藤 多津子 Goto T	○MSD-4
後藤 哲哉 Goto T	○SS15-4, MSD-3 O1-D16, O2-D10, P1-73, P1-81, PS-1
古西 清司 Konishi K	O2-C24, P1-107
小橋 基 Kobashi M	○P2-82
小早川 健 Kobayakawa T	P2-114
小林 一行 Kobayashi K	P1-31, ○P2-19
小林 冴子 Kobayashi-Kinoshita S	MSC-2, P1-29, ○P1-30, PS-8
小林 平 Kobayashi T	P2-129
小林 朋子 Kobayashi T	P2-153, ○P2-45, P2-46
小林 真之 Kobayashi M	○SS3-6, ○SS6-2, SS14-4, O2-D8, P1-51, P2-84, P2-90
小林 泰浩 Kobayashi Y	O2-D24, P1-35
小林 良喜 Kobayashi R	○SS12-2, P2-124, P2-130, P2-131

駒田 致和 Komada M	○P2-4
小松 浩一郎 Komatsu K	P1-36
小松 奈央 Komatsu N	○O1-D22
小松澤 均 Komatsuzawa H	O2-C23, P2-123
五味 一博 Gomi K	O2-D12, P1-29, P1-60, P1-71
小峰 雄介 Komine Y	P2-1, ○P2-93
古宮 宏記 Komiya H	○P1-49
小室 歳信 Komuro T	P2-160, P2-161
小守 壽文 Komori T	O1-C20, P1-64
小守 寿人 Komori H	P1-64
古谷野 潔 Koyano K	O2-D25, P1-70
小山 典子 Koyama N	P1-75, P2-24
是澤 和人 Koresawa K	O1-C21
近藤 信太郎 Kondo S	P2-6
近藤 壽郎 Kondoh T	P1-92
近藤 真啓 Kondo M	O2-D2, P1-54
近藤 信夫 Kondoh N	P1-12, P1-14, P1-15, P1-16, P1-18, P1-21, P1-24, P1-27
近藤 雄三 Kondo Y	P1-24
近藤 祐介 Kondo Y	○SS13-4, P1-53
近藤 雄太 Kondo Y	P2-111
近藤 康生 Kondo Y	P2-163
さ	
崔 翼龍 Cui Y	○SS3-5
齋藤 暁子 Saito A	P1-39
斎藤 英一 Saitoh E	O2-C3, P1-11
齊藤 一誠 Saitoh I	P1-103
斎藤 浩太郎 Saito K	○P1-76
斎藤 隆史 Saito T	P1-72
齊藤 久子 Saito H	SS11-2
齊藤 正人 Saitoh M	P1-127, P1-136, P1-138
齋藤 正寛 Saito M	O1-C14, O1-D18
齋藤 充 Saito M	SS9-2, P1-61
齋藤 真規 Saito M	P2-124, P2-130, ○P2-131
齋藤 まり Saito M	P1-29, P2-19, P2-8
佐伯 歩 Saeki A	●O1-C9, ○P1-102, P1-104, P2-144
佐伯 万騎男 Saeki M	○SS3-3, P2-98
坂 英樹 Saka H	O2-C17, O2-C19

- 阪井 丘芳 Sakai T ○L-1, ○KS-4, O2-C1, O2-C6, P1-1, P1-83, P1-141
 酒井 陽 Sakai A KS-1
 酒井 陽 Sakai K O2-D17, ○P1-87
 坂井 詠子 Sakai E P2-58, ○P2-67
 坂井 信裕 Sakai N P2-62
 坂上 宏 Sakagami H SS6-1, P1-137, P1-55, P2-151, ○P2-152
 坂上 竜資 Sakagami R P1-139, P2-14
 坂下 英 Sakashita H ○P1-79, P2-1, P2-61
 崎山 浩司 Sakiyama K P1-8, P1-9, P1-79, ○P2-1, P2-61, P2-93
 咲間 彩香 Sakuma A ○SS11-2
 佐久間 重光 Sakuma S O1-D19
 佐久間 哲史 Sakuma T ○FS-3
 櫻井 学 Sakurai S P1-15
 櫻井 敦中 Sakurai A ○P2-56
 砧 哲崇 Sako N P2-73, P2-86
 笹川 一郎 Sasagawa I O1-D15, ○P2-11
 佐々木 会 Sasaki A P1-137
 佐々木 佳世子 Sasaki T ○P2-6
 佐々木 啓一 Sasaki K ○SS11-4, P1-28
 佐々木 悠 Sasaki H P2-139
 佐々木 実 Sasaki M P1-114
 笹野 高嗣 Sasano T LS-3-2
 雀部 貴志 Sasabe T P2-38
 定岡 直 Sunao S SS1-2, ○P2-55
 佐藤 秋絵 Sato A O1-D15
 佐藤 絢 Sato A SS4-3
 佐藤 彩乃 Sato A ○P1-39
 佐藤 巖 Sato I O2-C16, P1-10, ○P2-3, P2-146
 佐藤 かおり Sato K P2-39
 佐藤 和彦 Satoh K ○P2-2
 佐藤 慶太 Sato K SS11-3
 佐藤 しづ子 Satoh-Kuriwada S LS-3-2
 佐藤 淳 Sato S O1-C20, O1-D10
 佐藤 亨 Sato T P1-96, P2-72
 佐藤 哲二 Sato T O2-C11
 佐藤 秀一 Satou S O2-D1, O2-D2, P1-54, P1-63
 佐藤 正樹 Sato M ○O2-D3, P1-50, P2-7
 佐藤 伸明 Sato N P1-118
 佐藤 惇 Sato J P1-126, P1-127
 佐藤 主税 Sato C ○MSA-4
 佐藤 友明 Sato T P1-128
 佐藤 匡 Sato T P1-5
 佐藤 佳昌 Sato K P1-47
 佐藤 毅 Sato T ○SS3-2
 佐藤 寿哉 Sato T ○P1-58
 佐藤 元 Sato H SS9-2
 佐藤 文彦 Sato F SS15-3, ○O2-D6
 佐藤 真理 Sato M MSA-4
 佐藤 真奈美 Sato M SS11-4
 佐藤 満成 Sato M ○P1-90, P2-113
 佐藤 義英 Satoh Y P2-81, P2-91
 佐藤 律子 Sato R ○P2-36
 實松 敬介 Sanematsu K ○Y-3, ○SS14-2
 佐野 英彦 Sano H P2-56
 佐野 夕子 Sano Y SS16-3
 佐原 資謹 Sahara Y MSC-4, P2-85
 猿田 樹理 Saruta J P1-119, P2-34
 沢 禎彦 Sawa Y P2-22
 沢田 啓吾 Sawada K SS16-3
- し
- 塩澤 光一 Shiozawa K ○P2-162
 塩屋 幸樹 Shioya K ○P2-120
 重村 憲徳 Shigemura N Y-3, ○LS-3-1, SS14-2, P2-74, P2-77
 宍戸 新一郎 Shishido S ○P2-87
 設楽 彰子 Shitara A ○SS13-3, ○P2-25
 篠 宏美 Shino H P1-39
 篠田 雅路 Shinoda M SS4-1, ○SS9-4, SS15-5, O2-D1, O2-D9, P1-49, P1-59, P1-63
 篠田 壽 Shinoda H P2-69
 芝 多佳彦 Shiba T O1-C12, P1-88
 柴田 健一郎 Shibata K O1-C9, P1-102, P1-104, P2-144
 柴田 俊一 Shibata S O1-C19, P2-42
 柴田 幸江 Shibata Y O1-C13, P1-111
 柴山 和子 Shibayama K P1-96, P2-118
 澁川 義幸 Shibukawa Y O2-D3, P1-50, P2-7, P2-9

渋谷 鑛 Shibutani K O2-C8
 島崎 絵美 Shimazaki E ○P1-32
 島田 明美 Shimada A P1-84, P2-165
 嶋田 淳 Shimada J P2-110
 島田 英知 Shimada H ○P1-131
 鷗田 みゆき Shimada M O2-D3, P1-50, P1-131,
 ○P2-7
 嶋谷 達哉 Shimatani T ○PS-4
 島谷 真梨 Shimatani M ○PS-5
 自見 英治郎 Jimi E O1-C16, O2-D11,
 O2-D23, P1-43, P2-147
 清水 綾 Shimizu A P1-126
 清水 康平 Shimizu K KS-5
 清水 典佳 Shimizu N SS4-1, O2-D8, P1-51,
 P2-90
 清水 真人 Shimizu M SS2-2, ○P2-10
 下田 信治 Shimoda S P1-36, P1-67, P2-20
 下村-黒木 淳子 Shimomura-Kuroki J
 P2-36
 下山 佑 Shimoyama Y P1-114
 社領 美紀 Sharyo M O1-C20, O1-D10
 朱 成淑 Jue SS ○P2-49
 肖 黎 Xiao L ○O2-C13
 庄司 あゆみ Shoji A ○P1-68
 庄司 憲明 Shoji N LS-3-2
 正村 正仁 Shoumura M P1-115
 白井 麻衣 Shirai M ○P1-36
 白子 要一 Shirako Y P2-39
 白鳥 卓麻 Shiratori T ●O2-D25, ○P1-70,
 P2-65
 進 正史 Shin M MSC-3, ○SS4-2,
 ●O1-D12, ○P1-46
 秦 昕 Qin X P1-64
 眞貝 洋一 Shinkai Y P2-165
 新谷 耕平 Shintani K ○P1-14, P1-18, P1-27
 新谷 誠康 Shintani S P2-9
 神野 正人 Jinno M P1-118

す

末永 華子 Suenaga H P1-28
 菅野 直之 Sugano N O2-D1, O2-D2, P1-54,
 P1-63
 菅原 敦信 Sugahara A P2-133

菅原 俊二 Sugawara S O1-C2, O1-C3, P1-109
 杉田 誠 Sugita M P2-23
 杉田 好彦 Sugita Y P1-118
 杉村 光隆 Sugimura M P1-81
 杉本 真也 Sugimoto S MSA-4
 杉本 朋貞 Sugimoto T P2-79
 杉本 昌弘 Sugimoto M P1-119
 杉山 明子 Sugiyama A ○P2-40
 杉山 哲也 Sugiyama T P1-62
 杉山 朋久 Sugiyama T SS9-4
 鈴木 厚子 Suzuki A P2-50, P2-53
 鈴木 邦明 Suzuki K P1-131, P1-134, P2-157
 鈴木 久仁博 Suzuki K P1-82
 鈴木 恵子 Suzuki K P2-53, ○P2-69
 鈴木 啓太 Suzuki K P2-108
 鈴木 達郎 Suzuki T ●O2-D2, ○P1-54
 鈴木 敏彦 Suzuki T SS11-4, O1-C9, P1-102,
 P1-104
 鈴木 直人 Suzuki N O1-D11
 鈴木 正敏 Suzuki M O2-C8
 鈴木 雄祐 Suzuki Y ○P1-92
 鈴木 礼子 Suzuki R P2-43
 須田 直人 Suda N Y-2, SS6-1, P1-43,
 P1-137
 須藤 遥 Sudo H P2-99
 砂田 勝久 Sunada K P2-104
 春原 正隆 Sunohara M O2-C16, ○P2-146, P2-3
 鷺見 成紀 Sumi S P1-12, P1-15, ○P1-21
 住友 倫子 Sumitomo T O2-C20, O2-C21,
 ○O2-C22, P1-89, P1-98,
 P2-127
 住友 伸一郎 Sumitomo S P1-12, P1-21
 諏訪部 武 Suwabe T P2-73, ○P2-86

せ

成徳 英理 Seitoku E ○P2-166
 瀬賀 拓哉 Segata T ●O2-C3, ○P1-11
 関 伸一郎 Seki S ○O2-C16, P2-146
 関 有里 Seki Y ○PS-6
 瀬田 祐司 Seta Y PS-9
 千堂 良造 Sendo R ○P1-81, PS-1
 泉福 英信 Senpuku H P1-92, P2-137

そ

曹 愛琳 Cao AL O1-C25, P1-4, ○P1-78,
P1-120
添野 雄一 Soeno Y ○O1-D7, P2-39
十川 紀夫 Sogawa N P2-35
園田 聡一朗 Sonoda S O1-D20, ○O1-D21,
O1-D23, O2-C14, P1-74
藺村 貴弘 Sonomura T SS2-5

た

平良 芙蓉子 Taira F ○P1-8, P1-9, P2-1
高井 理衣 Takai R P1-126
高井 信吾 Takai S ○P2-74
互野 亮 Tagaino T ○P1-28
高尾 知佳 Takao C SS6-3
高岡 裕 Takaoka Y SS6-3
高垣 裕子 Takagaki-Mikuni Y
P2-18
高木 律夫 Takagi R P2-80
高須 奈々 Takasu N ○P2-167, PS-11, PS-12
高田 隆 Takata T P1-124
高野 吉郎 Takano Y ○MSC-1, P2-20
高橋 有希 Takahashi A ○P1-130, P2-72
高橋 亜友美 Takahashi A ○P1-136, P1-138
高橋 一郎 Takahashi I O1-C7, P1-80, P1-132
高橋 理 Takahashi O O1-C14
高橋 かおり Takahashi K ○P1-85
高橋 茂 Takahashi S ○P2-31
高橋 潤 Takahashi J ○P1-24
高橋 俊介 Takahashi S SS5-3
高橋 哲 Takahashi T P1-26, P1-37
高橋 富久 Takahashi T O1-C18, P2-101
高橋 智美 Takahashi T ○P2-13
高橋 直之 Takahashi N O2-D24, P1-35
高橋 信博 Takahashi N P1-26, P1-28, P1-37,
P1-91, P2-133, P2-134
高橋 将人 Takahashi M O1-C19
高橋 睦 Takahashi M P2-81
高橋 幸裕 Takahashi Y O2-C24, P1-107
高見 正道 Takami M P2-62
高山 英次 Takayama E P1-12, P1-14, P1-15,
P1-16, P1-18, P1-21,

P1-24, P1-27
滝川 俊也 Takigawa T P2-40
滝川 正春 Takigawa M O2-D22, P2-70
瀧澤 将太 Takizawa S P2-93
滝沢 尚希 Takizawa N P2-108
瀧澤 智美 Hashizume-Takizawa T
P2-124, P2-130, P2-131
滝田 裕子 Takita H P2-13
瀧谷 佳晃 Takitani Y P1-16
田熊 一敏 Takuma K ○SS3-4
田隈 泰信 Takuma T P2-33
竹内 友規 Takeuchi T P2-15
竹内 弘 Takeuchi H O2-C9, P2-147, P2-149,
P2-59, P2-154
竹内 康雄 Takeuchi Y O1-C12, P1-88
竹内 優斗 Takeuchi Y P2-5, P2-54
竹内 麗理 Takeuchi R ○P2-156
竹下 徹 Takeshita T O1-C13, P1-110, P1-111
竹立 匡秀 Takedachi M ○SS16-3
武部 純 Takebe J P1-90
建部 廣明 Takebe H P1-72
竹村 明道 Takemura A P2-52
田崎 園子 Tasaki S O1-C15, P1-93, P1-97,
○P1-99, P1-106, P2-106,
P2-136, P2-143
田崎 雅和 Tazaki M O2-D3, P1-50, P2-7,
P2-9
田島 雅道 Tajima M ○P2-151
田代 有美子 Tashiro Y ○O2-C24
多田 浩之 Tada H PS-2
立浪 秀剛 Tachinami H P2-111
立花 誠 Tachibana M P1-84, P2-165
立岡 迪子 Tatsuoka M O1-D17
巽 勇介 Tatsumi Y P1-14, ○P1-18, P1-27
田中 昭男 Tanaka A P2-15
田中 晃伸 Tanaka A O2-C17, O2-C19
田中 亜生 Tanaka A ○P2-9
田中 雅士 Tanaka M P1-16
田中 光郎 Tanaka M P1-114
田中 芳彦 Tanaka Y O1-C15, P1-106, P1-93,
P1-97, P1-99, P2-106,
P2-136, P2-143
田中 志典 Tanaka Y O1-C2, O1-C3, P1-109
田中 陽介 Tanaka Y ○O1-D20, O1-D21,

田辺 俊一郎 Tanabe T
 谷口 奈央 Taniguchi N
 谷村 明彦 Tanimura A
 谷脇 裕人 Taniwaki H
 田畑 純 Tabata M
 田畑 光康 Tabata M
 田部 士郎 Tabe S
 玉村 亮 Tamamura R
 田村 功 Tamura I
 田村 正人 Tamura M
 田村 晴希 Tamura H
 田村 宗明 Tamura M
 田村 幸彦 Tamura Y
 田村-辻 潔美 Tsuji-Tamura K

O1-D23, O2-C14, P1-74
 P1-24
 ○P2-138
 ○MSA-1, ○SS3-1,
 O2-C5, P1-136, P1-138,
 P2-30, PS-5, PS-6
 P2-31
 O1-D15
 P2-79
 ○P1-40
 P1-82
 P2-48
 O2-C10, P1-25
 ○P2-125
 ○P2-141
 O2-D20, P1-140
 P1-25, ○O2-C10

田谷 雄二 Taya Y
 檀上 敦 Danjo A
 壇辻 昌典 Dantsuji M

○P2-39
 O1-C25, P1-120, P2-155
 ○P1-52

ち

千葉 厚子 Chiba A
 千葉 高大 Chiba T
 千葉 雄太 Chiba Y
 智原 栄一 Chihara E
 中條 貴俊 Chujo T
 長 環 Cho T
 張 旌旗 Zhang JQ
 張 皿 Chou B
 帖佐 直幸 Chosa N

P1-47
 ○P1-13
 KS-1, P1-87
 P1-15
 P1-127
 O1-C15, P1-106, P1-93,
 P1-97, P1-99, P2-106,
 P2-136, ○P2-143
 O1-C25, O2-D25, P1-4,
 P1-120, P1-70, P1-78,
 ○P2-65
 P2-147
 P2-108

つ

柄 慎太郎 Tsuka S
 塚原 飛央 Tsukahara T
 塚本 翔 Tsukamoto S
 槻木 恵一 Tsukinoki K

SS13-4, P1-53
 ○P1-128
 Y-2
 P1-119, P2-34

筑波 隆幸 Tsukuba T
 辻 光順 Tsuji
 辻極 秀次 Tsujigiwa H
 辻村 恭憲 Tsujimura Y
 津田 啓方 Tsuda H
 土屋 恵李佳 Tsuchiya E
 土屋 隆子 Tsuchiya T
 筒井 健夫 Tsutsui TW
 續橋 治 Tsudzukibashi O
 堤 貴司 Tsutsumi T
 堤 博文 Tsutsumi H
 常松 貴明 Tsunematsu T
 坪井 香奈子 Tsuboi K

P2-58, P2-67
 SS15-1
 P1-82
 SS15-1
 ○O1-D11
 PS-10
 P1-137
 ○P2-153, P2-45, P2-46
 P2-124, P2-129,
 ○P2-130, P2-131
 P2-16
 P2-160, ○P2-161
 ●O1-D5, ○P1-122
 P2-68, PS-7

て

出来田 雅人 Dekita M
 寺尾 豊 Terao Y
 寺町 順平 Teramachi J
 寺山 隆司 Terayama R

●O1-C7, ○P1-132
 P1-94, P1-103
 O2-D15, ○P2-71
 ○P2-79

と

土井 豊 Doi Y
 東 雅啓 To M
 堂前 英資 Domae E
 戸円 智幸 Toen T
 遠山 歳三 Toyama T
 戸蒔 彰史 Togari A
 都合 亜記暢 Togo A
 戸田 伊紀 Toda I
 戸田 孝史 Toda T
 戸田 雅子 Toda M
 飛田 護邦 Tobita M
 富永 和也 Tominaga K
 富山 潔 Tomiyama K
 友田 恵利佳 Tomoda E

P1-14, P1-24
 ○P1-119, P2-17, P2-18,
 P2-34
 ○O1-C6, P2-57
 P2-104, ○P2-115
 P2-139
 O1-D8
 SS2-1
 ○SS5-2, ○P2-52
 P2-87
 O1-D17, ○P2-41
 ○SS16-5
 ○P2-15
 ○O1-C14
 O1-D20, O1-D21,
 O1-D23, ●O2-C14,
 ○P1-74

土門 久哲 Domon H
 土門 卓文 Domon T
 豊澤 悟 Toyosawa S

P1-103
 P2-31
 O1-C20, O1-D10

豊田 博紀 Toyoda H ○SS9-2
 豊留 宗一郎 Toyodome S ○P1-73, P1-81, PS-1
 豊野 孝 Toyono T PS-9
 豊福 明 Toyofuku A SS6-3
 鳥井 康義 Trii Y P1-118
 鳥居 大祐 Torii D P2-153, P2-45, ○P2-46
 鳥海 拓 Toriumi T ○P2-12

な

内藤 昌子 Naito M ○O1-C18, P2-101
 内藤 真理子 Naito M P2-119
 永井 重徳 Nagai S O1-C4, O1-C5, P1-41, P1-112
 中尾 龍馬 Nakao R ○P2-137
 永尾 潤一 Nagao J O1-C15, P1-93, P1-97, P1-99, P1-106, ○P2-106, P2-136, P2-143
 長尾 哲二 Nagao T P2-4
 長岡 正博 Nagaoka M P2-53, P2-69
 長岡 紀幸 Nagaoka N ○SS2-3, SS2-4
 中川 一路 Nakagawa I O1-C12, P1-88
 永倉 遼太郎 Nagakura R ○P1-2
 長崎 敦洋 Nagasaki A P1-124
 中澤 敬信 Nakazawa T SS3-4
 中澤 太 Nakazawa F O2-C25, O2-C26, P1-105, P1-108, P2-140
 中島 和久 Nakashima K P1-84, P2-165
 中島 一記 Nakashima K P2-22
 中島 友紀 Nakashima T P1-45, P1-68
 永嶌 勝之 Nagashima K ○O1-D3
 永嶋 義直 Nagashima Y P1-47
 中田 匡宣 Nakata M O2-C20, O2-C21, O2-C22, P1-89, P1-98, P2-126, ○P2-127
 永田 健吾 Nagata K P1-125
 中谷 暢佑 Nakatani Y P2-80, P2-91
 中津 晋 Nakatsu S P1-47
 中塚 美智子 Nakatsuka M ○P2-48, P2-164
 長塚 仁 Nagatsuka H P1-82
 中富 千尋 Nakatomi C ○O1-C16, O2-D11, O2-D23, P2-147
 中富 満城 Nakatomi M O1-C16, O1-D15, ○P2-47, PS-9

中西 博 Nakanishi H SS9-1, O1-C7, P1-132
 仲西 康裕 Nakanishi Y SS1-4
 中西 祐一郎 Nakanishi Y P2-167, ○PS-11, PS-12
 中野 敬介 Nakano K P1-82, P2-97
 仲野 道代 Nakano M P2-121
 中野 善夫 Nakano Y P2-138
 永野 恵司 Nagano K ○O1-C10, P1-90, P2-112, P2-113
 長野 孝俊 Nagano T P1-29, P1-71
 長濱 諒 Nagahama R ○P1-44
 中原 貴 Nakahara T P2-153
 永原 國央 Nagahara K P1-24
 永峰 史 Nagamine F P2-159
 中村 昭博 Nakamura A ○P2-38
 中村 桂一郎 Nakamura K SS2-1
 仲村 健二郎 Nakamura K P2-142
 中村 史朗 Nakamura S SS15-2, O2-D5, P1-52, ○P2-83, P2-89
 中村 誠司 Nakamura S O1-D1, O1-D9, P1-19, P1-116, P1-117, P1-123, P1-125
 中村 卓史 Nakamura T KS-1, O1-C24, ○O2-D16
 中村 友昭 Nakamura T O2-D16
 中村 徳三 Nakamura N P2-38
 中村 典史 Nakamura N P1-73
 中村 浩彰 Nakamura H P1-77
 中村 雅典 Nakamura M P2-26
 中村 美どり Nakamura M ○P1-35
 中村 安孝 Nakamura Y P2-159
 中村 芳樹 Nakamura Y O2-D14, P1-67, P1-84, P2-20, P2-92, P2-165
 中村 渉 Nakamura W P2-167, PS-11, PS-12
 中本 哲自 Nakamoto T SS13-4, P1-53
 中安 喜一 Nakayasu Y ○P1-115
 中山 希世美 Nakayama K SS15-2, O2-D5, P1-52, P2-83, P2-89
 中山 浩次 Nakayama K P2-118, P2-119
 中山 真彰 Nakayama M ○Y-4, ○P2-119
 那小屋 公太 Nagoya K ○O2-D5
 梨田 智子 Nashida T P2-36
 成田 由香 Narita Y O1-C15, P1-93, P1-106, P1-97, P1-99, P2-106, ○P2-136, P2-143

成山 明具美 Nariyama M O2-D13, P2-92, ○P2-95
 南部 隆之 Nambu T O1-C11, P2-132
 南保 明日香 Nanbo A SS4-3

野代 知孝 Nodai T ○P1-56, P1-57, P2-75
 野中 和明 Nonaka K O1-D23, O2-C14, P1-74
 野中 直子 Nonaka N ○P2-26
 野水 基義 Nomizu M ○KS-2

に

新津 洋司郎 Niitsu Y ○FS-2
 仁木 佳文 Niki Y P1-47
 西井 直人 Nishii N ○P2-111
 西岡 貴志 Nishioka T PS-2
 西川 哲成 Nishikawa T P2-15
 西川 泰央 Nishikawa Y P2-21, P2-88
 西下 一久 Nishishita K P2-58, P2-67
 西田 崇 Nishida T O2-C7, ○O2-D22
 西出 真也 Nishide S ○SS4-3, ○P2-150
 西原 達次 Nishihara T O1-C8, P1-33, P1-40,
 P1-95, P1-101, P1-133,
 P2-100, P2-107
 西村 正宏 Nishimura M SS2-5
 西村 学子 Nishimura M P1-126, P1-127
 二宮 禎 Ninomiya T ○P1-77
 二ノ宮 裕三 Ninomiya Y Y-3, SS14-2, P2-74,
 P2-77
 二藤 彰 Nifuji A P1-84, P2-165
 丹羽 堯彦 Niwa T P1-31, ○P1-71, P2-19

ぬ

沼崎 研人 Numazaki K ○PS-2
 沼田 由美 Numata Y ○P1-96
 沼部 幸博 Numabe Y P2-115

ね

根津 顕弘 Nezu A MSA-1, ○O2-C5,
 P2-30, PS-5
 根本 孝幸 Nemoto T P1-114, P2-114
 根本 優子 Ohara-Nemoto Y P1-114, ○P2-114

の

野川 泰葉 Nogawa Y ○P2-89
 野田 百合 Noda Y O1-C20, ○O1-D10
 野田 千尋 Noda C ○PS-8

は

橋口 千琴 Hashiguchi C SS2-5
 橋口 有真 Hashiguchi Y P1-117, ○P1-123
 橋本 修一 Hashimoto S P2-104, P2-115
 橋本 均 Hashimoto H SS3-4
 橋本 麻利江 Hashimoto M O1-C15, P1-93, ○P1-97,
 P1-99, P1-106, P2-106,
 P2-136, P2-143
 橋本 正次 Hashimoto M P2-159
 橋本 真奈 Hashimoto M ○SS2-3
 長谷川 敬展 Hasegawa T P2-27, PS-4
 長谷川 智香 Hasegawa T P2-56, P2-68, PS-7,
 PS-10
 長谷川 尚哉 Hasegawa N ○P1-137
 長谷川 博雅 Hasegawa H P2-97
 長谷川 真奈 Hasegawa M ○P1-48, P2-80, P2-91
 長谷川 義明 Hasegawa Y O1-C10, P1-90,
 ○P2-112, P2-113
 長谷部 晃 Hasebe A O1-C9, P1-102, P1-104,
 ○P2-144
 長谷部 茂 Hasebe S SS3-4
 畠 賢一郎 Hata K ○SS16-4
 畑 隆一郎 Hata R O1-D6, P1-121
 秦 史子 Hata F ○PS-3
 畠山 慧 Hatakeyama S SS5-4
 畠山 純子 Hatakeyama J P2-22
 畠山 雄次 Hatakeyama Y P2-22
 八田 光世 Hatta M P1-139
 服部 高子 Hattori T ○O2-C7
 埴岡 隆 Hanioka T P2-138
 羽地 達次 Haneji T P2-71
 馬場 麻人 Baba O O2-C16
 馬場 一美 Baba K P1-34, P2-89
 馬場 友巳 Baba TT P2-114
 浜田 信城 Hamada N SS5-3, O1-C14, P2-116,
 P2-139
 浜村 和紀 Hamamura K ○O1-D8, PS-13
 早崎 治明 Hayasaki H P1-103

林 徹 Hayashi T ○SS13-2
 林 慶和 Hayashi Y ●O1-D1, ○P1-19
 原 徹 Hara T SS2-3
 原 矢委子 Hara Y ○O2-C11
 原田 卓哉 Harada T P2-103
 原田 英光 Harada H ○MSC-4, O1-D13,
 O1-D17
 原田 浩之 Harada H P2-111
 原田 文也 Harada F P1-127
 坂東 康彦 Bando Y P1-8, P1-9, P1-79, P2-1,
 ○P2-61, P2-93
 半谷 純一 Hanya J ○P2-157

ひ

東 泉 Higashi S P2-59, P2-154
 東川 明日香 Higashikawa A O2-D3, P1-50, P2-7
 疋田 温彦 Hikita A ○MSA-2
 引地 尚子 Hikiji H O1-C8, P1-40, P1-101
 樋田 京子 Hida K ○SS10-5
 人見 涼露 Hitomi S P1-56, P1-57, ○P2-75
 樋野 雅文 Hino M P2-96
 日比 英晴 Hibi H P1-87
 平井 麻絵 Hirai A SS16-3
 平居 貴生 Hirai T ○Y-1
 平井 大地 Hiraki D P1-126
 平井 幸彦 Hirai Y P1-130
 平岡 行博 Hiraoka Y P2-120
 平木 圭佑 Hiraki K ○P1-62
 平澤 (有川) 恵理 Hirasawa E
 ○KS-3, O2-C12, P1-23
 平嶋 伸悟 Hirashima S SS2-1
 平田 淳司 Hirata A ○P1-135
 平田 牧子 Hirata M P2-149
 平田 雅人 Hirata M O1-D1, O2-C9, P1-19,
 P2-148, P2-149
 平田-土屋 志津 Hirata-Tsuchiya S
 P2-147
 平塚 浩一 Hiratsuka K O2-C8, P2-156
 平場 勝成 Hiraba K O2-D4
 平林 文香 Hirabayashi F ○P1-133
 平嶺 浩子 Hiramine H ○P2-116, P2-139
 廣井 美紀 Hiroi M ○P2-110
 廣内 英智 Hirouchi H O1-C21

廣瀬 勝俊 Hirose K ○O1-C20, O1-D10
 広瀬 雄二郎 Hirose Y O2-C20, ○P1-98
 廣瀬 由紀人 Hirose Y SS1-4
 弘田 克彦 Hirota K P1-100
 廣野 力 Hirono C P2-23

ふ

武 洲 Wu Z ○SS9-1, O1-C7, P1-132
 深田 哲也 Fukada T ○P2-104, P2-115
 深町 はるか Fukamachi H ○P2-122
 深見 秀之 Fukami H ○P2-85
 福井 佳代子 Fukui K ○P2-142
 福島 秀文 Fukushima H KS-5, O1-D3
 福島 由香乃 Fukushima Y ○P1-45
 福間 裕 Fukuma Y P2-67
 福本 敏 Fukumoto S KS-1, KS-5, O1-D3,
 O2-D16, O2-D17, P1-80,
 P1-91, P1-138
 藤井 慎介 Fujii S SS10-2, ○O1-D2,
 P1-125
 藤井 規孝 Fujii N P1-48, P2-80, P2-91
 藤井 真由子 Fujii M ○P1-38
 藤岡 容一郎 Fujioka Y SS4-3
 藤川 芳織 Fujikawa K ○O1-C19
 藤川 順司 Fujikawa J P2-5, ○P2-54
 藤田 剛 Fujita T O1-D22, P1-129
 藤田 隆寛 Fujita T P2-22
 藤田 雅子 Fujita M P2-82
 藤田 雅俊 Fujita M ○P1-5
 藤田 真理 Fujita M ○P2-140
 藤田 美也子 Fujita M P2-115
 藤田 裕 Fujita Y O2-C8
 藤中 英剛 Fujinaka H P1-47
 藤浪 さをり Fujinami S PS-8
 藤村 朗 Fujimura A SS5-4
 藤本 哲也 Fujimoto T ○P2-88
 藤本 舞 Fujimoto M ○Y-2
 藤原 尚樹 Fujiwara N MSC-4, O1-D13,
 O1-D17
 藤原 奈津美 Fujiwara N ○P1-100
 鮒田 啓太 Funada K P1-80
 船登 咲映 Funato S ○P1-34
 船戸 紀子 Funato N ○O1-D26

古川 みなみ Furukawa M P1-128
 古澤 利武 Furusawa T ○SS1-1, SS1-2, SS1-7
 古庄 寿子 Furusho H ○P1-124
 古山 昭 Furuyama A ○P2-32

ほ

星川 聖良 Hoshikawa S O1-D3
 保住 建太郎 Hozumi K KS-2
 細川 隆司 Hosokawa R SS13-4, P1-53, P1-57,
 P2-59
 細矢 明宏 Hosoya A P1-77, P2-48
 細矢 哲康 Hosoya N P1-31
 堀田 正人 Hotta M P1-14, P1-18, P1-27
 堀内 浩水 Horiuchi H SS4-3
 堀江 俊 Horie T P2-145
 堀口 美香 Horiguchi M SS4-3
 堀貫 恵利 Horinuki E ●O2-D8, ○P1-51,
 P2-90
 本郷 裕美 Hongo H P2-68, PS-7
 本田 秀太 Honda S P2-15
 本田 雅規 Honda M O1-D19, O2-C2, P2-12,
 PS-13
 本田 由馬 Honda Y P1-118
 本田 訓也 Honda SS9-4
 本間 志保 Honma S ○P2-78

ま

間石 奈湖 Maishi N SS10-5
 前川 知樹 Maekawa T ○P1-94
 前田 健康 Maeda T P1-94
 前田 豊信 Maeda T ○P2-50, ○P2-53
 前田 伸子 Maeda N P1-113
 前田 初彦 Maeda H P1-118
 前畑 洋次郎 Maehata Y O1-D6, P1-121
 真柄 仁 Magara H SS15-1
 牧 憲司 Maki K P1-33
 槇 宏太郎 Maki K P1-44
 蒔苗 剛 Makinae T ○P1-114
 正木 千尋 Masaki C SS13-4, P1-53, P1-57
 眞島 いづみ Mashima I O2-C25, ●O2-C26,
 ○P1-105, P1-108
 真下 千穂 Mashimo C O1-C11, ○P2-132

増田 裕次 Masuda Y P2-76, P2-91
 町谷 亜位子 Machiya A ○P1-43
 松井 美紀子 Matsui M P2-153, P2-46
 松尾 雅斗 Matsuo M ○SS5-3, P1-119,
 ○P2-17, P2-18
 松尾 美樹 Kawada-Matsuo M ○O2-C23
 松尾 友紀 Matsuo Y P1-64
 松尾 龍二 Matsuo R P2-82
 松口 徹也 Matsuguchi T ○O2-D19, O2-D21,
 P1-20
 松下 健二 Matsushita K PS-2
 松田 貴絵 Matsuda K P2-135
 松田 紗衣佳 Matsuda S P1-115
 松田 真司 Matsuda S P1-129
 松田 敏夫 Matsuda T SS3-4
 松田 美穂 Matsuda M ○P2-148
 松田 哲史 Matsuda Y P2-164
 松田 裕子 Matsuda Y P2-22
 松永 智 Matsunaga S ○O1-C21, O2-C15,
 P1-2, P1-3
 松永 知子 Matsunaga T ○O2-D4
 松原 琢磨 Matsubara T O1-C16, O2-D11,
 ○O2-D23, P2-147
 松本 真司 Matsumoto S ○SS10-2, O1-D2
 松本 裕子 Matsumoto H P2-156
 松山 晃文 Matsuyama A SS16-3
 松山 篤史 Matsuyama A ○P2-154
 馬目 歩実 Manome A ○P1-91
 丸尾 幸憲 Maruo Y SS2-4
 丸濱 功太郎 Maruhama K P2-79
 円山 由郷 Maruyama Y O1-C11, P2-132
 丸山 史人 Maruyama F O1-C12, P1-88
 丸山 澄 Maruyama S ○P2-160, P2-161

み

見明 康雄 Miake Y P2-163
 三浦 治郎 Miura J ○SS2-2, O1-D14,
 P1-66, P2-10
 三浦 裕仁 Miura H P1-61
 三上 正人 Mikami M O1-D15, P2-11
 三上 友理恵 Mikami Y ○P1-125
 美島 健二 Mishima K P1-34
 三島 弘幸 Mishima H ○P2-163

水越 堅司 Mizukoshi K P1-75, ○P2-24
 水田 誉人 Mizuta T Y-2
 水之江 義充 Mizunoe Y MSA-4
 水橋 史 Mizuhashi F P2-36
 溝上 顕子 Mizokami A ○O2-C9, P2-149
 溝口 到 Mizoguchi I P2-33
 溝口 利英 Mizoguchi T ○SS10-1
 溝口 尚子 Mizoguchi N ○SS14-4
 三谷 章雄 Mitani A ○SS16-1
 道川 誠 Michikawa M ○MSD-1
 美藤 純弘 Mitoh Y P2-82
 南川 元 Minamikawa H P1-131, P1-134, P2-157
 嶺岸 誠 Minegishi M PS-4
 三原 聖美 Mihara K O1-D24, P1-65
 美原 希美 Mihara N ●O1-D4, ○P1-17
 宮内 睦美 Miyauchi M P1-124
 宮川 博史 Miyakawa H P2-140
 宮城 勇大 Miyagi Y SS13-4, P1-61
 三宅 洋一郎 Miyake Y P1-100
 三宅 言輝 Miyake G ○P1-9, P2-1
 三宅 実 Miyake M SS11-1
 宮崎 敏博 Miyazaki T P1-64
 宮崎 佳奈子 Miyazaki K P1-80
 宮新 美智世 Miyashin M O2-D20, P1-140
 宮本 阿礼 Miyamoto A Y-2
 宮本 洋一 Miyamoto Y ○SS8-4, P1-34
 三好 代志子 Miyoshi Y P2-18
 三羽 信比古 Miwa N O2-C13
 三輪 容子 Miwa Y ○SS5-1, O2-C16, P1-10, P2-3

む

向井 義晴 Mukai Y O1-C14
 向坊 太郎 Mukaibo T SS13-4, P1-53
 椋代 義樹 Mukudai Y P1-22
 武藤 麻未 Mutoh M O1-C1, P1-7
 宗政 翔 Munemasa T SS13-4, ○P1-53
 村上 和弘 Murakami K P2-133
 村上 圭史 Murakami K P1-100
 村上 伸也 Murakami S SS10-3, SS16-3
 村上 幸孝 Murakami Y P2-145
 村田 佳織 Murata K P1-136, ○P1-138
 村田 勝 Murata M SS1-5

村松 敬 Muramatsu T P2-72
 村松 泰徳 Muramatsu Y P1-12, P1-75
 村本 和世 Muramoto K SS14-4, P2-29
 村山 翔太 Murayama S ○P2-84
 室伏 貴久 Murofushi T O1-D11

も

毛利 泰士 Mori Y O2-C21, O2-C22, P1-89
 望月 浩幸 Mochizuki H O2-D3, P1-50
 望月 文子 Mochizuki A SS15-2, O2-D5, P1-52, P2-83, P2-89
 本橋 宏美 Motohashi H ○P1-22
 森 一将 Mori K P2-110
 森 啓輔 Mori K O1-C25, P1-120, ○P2-155
 森石 武史 Moriishi T P1-64
 森岡 政彦 Morioka M ●O1-D9, ○P1-116
 森川 哲郎 Morikawa T P1-126, P1-127
 盛口 敬一 Moriguchi K ○O2-C2
 森崎 弘史 Morisaki H P2-122
 森島 浩允 Morishima H ○P1-26, P1-37
 森田 純晴 Morita S O1-C21
 森田 貴雄 Morita T MSA-1, O2-C5, P1-136, P1-138, ○P2-30
 森田 匠 Morita T O2-D4
 森田 知里 Morita C O1-D14, P1-66
 森田 航 Morita W P2-42
 森本 千晶 Morimoto C SS16-3
 森山 啓司 Moriyama K P1-68
 茂呂 祐利子 Moro Y ○P2-103
 諸富 孝彦 Morotomi T P2-154

や

八重柏 隆 Yaegashi T P2-108
 八上 公利 Yagami K ○SS1-2, SS1-7, P2-55
 八木澤 由佳 Yagisawa Y O2-D13, O2-D14, P2-92, P2-95
 矢島 健大 Yajima T P1-5
 安尾 敏明 Yasuo T ○P2-73, P2-86
 安原 理佳 Yasuhara R P1-34
 安松 啓子 Yasumatsu K ○P2-77
 矢谷 博文 Yatani H ○CS-4

吉田 竜介 Yoshida R
 吉田 泰士 Yoshida T
 吉田 和加 Yoshida W
 吉原 久美子 Yoshihara K
 吉村 建 Yoshimura K
 吉村 健太郎 Yoshimura K
 吉村 卓也 Yoshimura T
 吉村 成美 Yoshimura N
 吉村 弘 Yoshimura H
 吉村 文信 Yoshimura F

 吉村 善隆 Yoshimura Y
 吉本 勝彦 Yoshimoto K
 吉本 怜子 Yoshimoto R

 依田 哲也 Yoda T

○P2-113, P2-117
 ○SS9-3, SS14-2
 ○PS-7
 P1-118
 SS2-4
 P2-36
 P1-34
 P1-73
 P1-81, PS-1
 P2-27, PS-4
 O1-C10, P1-90, P2-112,
 P2-113
 P1-131, P1-134, P2-157
 P2-158
 SS6-3, O1-C25, ○P1-4,
 P1-78, P1-120, P1-125
 SS3-2

㍷

李 昌一 Lee M
 李 智媛 Lee J-W
 李 千萬 Lee CM
 陸 路 Lu L

○SS8-3
 MSA-3, ○SS10-4
 SS16-3
 ●O1-C3, ○P1-109

笠 孝成 Ryu T P1-139

わ

若林 則幸 Wakabayashi N P2-89
 若森 実 Wakamori M O1-C24, O2-D16, P1-85
 脇坂 聡 Wakisaka S SS10-3, P2-164, P2-5,
 P2-54, P2-78

 鷺尾 絢子 Washio A P2-154
 鷺尾 純平 Washio J P1-26, P1-28, P1-37,
 ○P2-134
 ○P2-165
 和田 悟史 Wada S P1-125
 和田 裕子 Wada H O1-C14, P2-116,
 ○P2-139
 渡辺 幸嗣 Watanabe K P2-38
 渡部 茂 Watanabe S P1-55, P2-38
 渡辺 孝康 Watanabe T ●O1-C12, ○P1-88
 渡辺 泰平 Watanabe T P2-38
 渡辺 雅弘 Watanabe M ●O2-D1, ○P1-63
 渡邊 竜太 Watanabe R P2-2
 綿引 麻美 Watahiki A O1-D3
 和唐 雅博 Wato M P2-15