

## 細胞社会における細胞外マトリックス分子の機能

二宮 善文

岡大 院医歯薬 分子医化

様々な生命現象の中で、細胞の仕組みが飛躍的に解明されてきている。これまで、細胞膜や細胞内の多様な小器官がどのように機能するかが生命科学の中心として解析されてきた。さらに、これまで静的な物質と考えられていた細胞外マトリックスが細胞の外からリガンドとして作用し、細胞膜上のレセプターに多様であるが規則性をもって反応することがわかってきている。すなわち、細胞外から細胞内のシグナル伝達を介して、遺伝子発現に変化を及ぼし、細胞の基本的活動に大きく影響を及ぼしているのである。従って、細胞は複数の細胞外分子を介した相互作用によって細胞社会を形成し、機能単位としての組織を作り上げている。

ゲノム情報の増加によって、さまざまな動物種の細胞外マトリックスタンパク質の解析が可能となった。なかでも、特殊な細胞外マトリックスタンパク質の集団である基底膜もその例外ではない。脊椎動物における研究から始まって、最近の無脊椎動物での解析から、すべての基底膜は、相互作用するタンパク質の共通セット、すなわち、IV型コラーゲンの主要ネットワークにラミニン、ナイドジェン、パールカンが相互作用して構成されている (Yurchenco PD, 2011)。これら基底膜タンパク質の構成成分は、脊椎動物と無脊椎動物の両方で共有され、「基底膜ツールキット」 (Carroll SB *et al.* “From DNA to Diversity” 2001, Whittaker CA *et al.* 2006, Hynes RO 2012) として動物界の基盤的な分子群という概念でとらえられるようになった。

ここでは、我々の研究室がこれまで行ってきた、IV型コラーゲン、XV/XVIII型コラーゲン、リンクプロテイン等の細胞外マトリックス分子の組織特異性と多様な存在様式の例、生命現象のなかで重要な機能と関わっている例、さらに細胞外マトリックス分子産物もしくはその断片が疾患の治療に応用されている例等を述べる。

L-1

アメロプラスチンによるエナメル芽細胞分化制御メカニズムの解明

福本 敏

東北大 院歯 小児発達歯

エナメル芽細胞は、組織特異的な蛋白質であるエナメル基質を分泌し、エナメル質形成に関わっている。エナメル基質の1つであるアメロプラスチンは、エナメル基質中においてその存在比率が10%以下の非アメロジェニン分子群に分類されるが、mRNAの発現レベルにおいては、最も発現の高い基質である。

アメロプラスチン欠損マウスの解析から、本分子は細胞接着活性を有し、基底膜が消失した後の足場蛋白としての機能を有していることが明らかとなり、エナメル上皮の細胞増殖停止機構の一翼を担っていた。さらに最近ではヒトの歯原性腫瘍の原因遺伝子であることが相次いで報告された。

次にアメロプラスチンが、如何に組織特異的に発現し、その分子機能を発揮するのかを明らかにする目的で、アメロプラスチン発現誘導因子の検索を行った。増殖因子等においては、TGF $\beta$ 1が一時的な発現を促進し、BMP2やNT-4が持続的な発現に関わっていることを見いだした。また転写因子においては、エピプロフィン/Sp6、Sp3やRunx2がその発現制御に関わっていた。また、細胞間結合分子の1つであるCx43によるギャップ結合の存在が、増殖因子を介したアメロプラスチン発現に必須であることを発見した。特に、Cx43は細胞間のIP3の輸送に関わり、増殖因子刺激による細胞内カルシウムの持続的な上昇と、ERK1/2のリン酸化に関わり、これらの相互作用によりアメロプラスチン発現制御誘導が行われるが、Cx43の機能異常はヒトにおいてエナメル質形成不全を引き起こしていた。つまり適切な細胞間結合がエナメル芽細胞分化には重要であることが判明した。これらの知見をもとに、iPS細胞からエナメル芽細胞への分化誘導を試みた結果、アメロプラスチン陽性の歯原性上皮細胞の誘導に成功した。この誘導過程にはアメロプラスチンが必須であり、さらに前述のNT-4が歯原性上皮への分化に関わっている可能性が示唆された。

L-2

Clinical Problem を見据えた転写因子 NF- $\kappa$ B による骨代謝調節機構の解明

自見英治郎

九歯大 健康増進科学 分子情報生化学

転写因子 NF- $\kappa$ B は免疫応答、炎症の発症や進行など様々な生命現象に関わる遺伝子発現を調節する転写因子である。我々は主に、破骨細胞による骨吸収における NF- $\kappa$ B の重要性を示してきた。我々の最初の報告の後に、NF- $\kappa$ B の p50 および p52 サブユニットの2重欠損マウスが破骨細胞の存在しない大理石骨病を呈することが報告された。また破骨細胞分化誘導因子 Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) は NF- $\kappa$ B を活性化し、NF- $\kappa$ B の選択的阻害剤 (NBD ペプチド) が RANKL による破骨細胞形成を抑制するだけでなく、コラーゲン関節炎モデルで関節破壊を抑制することを示した。現在では、破骨細胞分化に必須の NFATc1 の上流に NF- $\kappa$ B が存在することが明らかとなっており、破骨細胞分化に NF- $\kappa$ B が重要な役割を担っていることが広く受け入れられている。

一方、大きな骨欠損部位では骨を再生しなければ、その機能を回復することができない。BMP は骨誘導能を有する唯一のサイトカインでありながら、臨床の場において期待通りの効果が得られていない。我々は、NF- $\kappa$ B と BMP シグナルが相反する生理作用を有することに着目し、活性化された NF- $\kappa$ B が BMP のシグナル分子 Smad の DNA 結合を阻害することで、BMP の効果を抑制することを明らかにした。さらに NF- $\kappa$ B の阻害剤が BMP による骨形成を促進することも見いだした。

また乳癌や肝臓癌などの様々な癌では、NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化されていることが知られている。我々は、NF- $\kappa$ B による口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤機構を解明する目的で、マウス扁平上皮癌細胞株 SCCVII 細胞を C3H/HeN マウスに移植し、腫瘍接種1週間後から NBD ペプチドを投与した。NBD ペプチドは、破骨細胞形成を抑制する他に、腫瘍細胞の増殖抑制とアポトーシスの誘導により顎骨浸潤を抑制することを報告した。

このように我々は、『NF- $\kappa$ B』をキーワードとし、遺伝子改変マウスを用いて NF- $\kappa$ B による骨代謝調節機構を明らかにするとともに、骨再生や口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤といった歯科口腔領域の疾患への応用を目指している。

Y-1

顎顔面部の異所性異常疼痛に対する  
NGF と TRPV1 の役割

篠田 雅路

日大 歯 生理

下顎歯の歯髄炎や歯周炎が原因で、健全な上顎歯に異常な歯痛を訴える症例に時折遭遇するが、このように炎症部位から離れた場所に異常疼痛が発症するメカニズムは不明である。今回、顎顔面部の局所炎症による異所性熱痛覚過敏に対する Nerve growth factor (NGF) および Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の役割を検討した。

マウス下口唇（三叉神経第Ⅲ枝領域）へ complete Freund's adjuvant (CFA) 注射することにより、口髭部（三叉神経第Ⅱ枝領域）に熱痛覚過敏が発症し、三叉神経節において TRPV1 陽性の三叉神経第Ⅱ枝領域投射ニューロン数が増加した。下口唇への CFA 注射後、三叉神経節において NGF mRNA は検出されなかったが NGF protein 量が増加した。さらに、TRPV1 拮抗薬 (SB366791) の腹腔内投与により、その熱痛覚過敏は濃度依存的に抑制された。また、下口唇への NGF 持続投与により口髭部に熱痛覚過敏が発症した。下口唇への CFA 注射による口髭部の熱痛覚過敏は、下口唇への NGF 中和抗体持続投与により有意に抑制された。下口唇への labeled-NGF 注射後、三叉神経節において labeled-NGF 陽性の三叉神経第Ⅱ枝領域投射ニューロンが観察された。

以上のことから、三叉神経第Ⅲ枝領域の局所炎症により局所で放出された NGF が三叉神経節へ逆行性に軸索輸送され、その NGF が三叉神経節内で三叉神経第Ⅱ枝領域投射ニューロンにおける TRPV1 発現を増加させることにより、三叉神経第Ⅱ枝領域に熱痛覚過敏が発症する可能性が示された。

Y-2

低分子量 G タンパク質 Rac1 の四肢形成における機能解析

鈴木 大

昭大 歯 口腔生化

Rac1 は Rho ファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質で、アクチン細胞骨格系の制御を介した細胞運動を通して、個体発生、発癌、神経細胞のネットワークなど生体の様々な高次機能を制御している。我々は四肢形成における Rac1 の機能を解明するために、Cre リコンビナーゼを *Prx1* 遺伝子エンハンサー制御下で発現させることのできるトランスジェニックマウスと、*Rac1* 遺伝子エクソン 1 の両側に loxP 配列を挿入した flox マウスを交配させ、主に胎生期の肢芽間充織細胞において *Rac1* 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作成した。その表現型から *Rac1* 遺伝子の四肢形成および肢芽指間域における細胞死に対する機能解析を行った。

四肢形成に関して *Rac1* cKO マウスは上肢、下肢ともに短く、骨格標本および組織解析から長骨管における骨化の遅延が確認された。さらに第二指から第四指にかけて指間の癒合が認められた。野性型マウスの指間は、胎生 12 日から 14 日の間でプログラム細胞死が起こり、胎生 15 日までに指間が分離する。そこで胎生 13.5 日および 14.5 日における指間域のプログラム細胞死を検討したところ、*Rac1* cKO マウスではコントロールマウスと比較し、第二指から第四指の指間で TUNEL 陽性細胞数が顕著に減少していた。さらにプログラム細胞死関連遺伝子群の発現様式を Whole-mount *in situ* hybridization 法により検討した結果、*Bmp2/7* は胎生 12.5 日および 13.5 日において、また、*Msx1/2* は胎生 13.5 日において *Rac1* cKO マウスの肢芽指間域で発現が減少していることが確認された。

以上の結果から、*Rac1* は四肢の形成に重要であり、またプログラム細胞死関連遺伝子の発現調節を介して肢芽指間域における細胞死を制御しているものと考えられる。

Y-3

微生物間相互作用による潜伏感染ウイルスの再活性化

今井 健一

日大 歯 細菌

口腔には細菌に加え多くのウイルスが存在している。口腔のウイルス感染は全身疾患とも密接な関係があるばかりでなく、口腔には診断上重要な手がかりとなる多くの病変が現れる。近年、歯周病と全身疾患との関連性が明らかとなる中、われわれは「細菌とウイルスとの微生物間相互作用」の観点から、歯周病の HIV や EBV およびインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響を検討している。その一環として、歯周病原菌がエピジェネティック制御により潜伏感染 HIV や EBV を再活性化することを明らかにした。

潜伏感染ウイルスは、自らのプロモーター領域にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) をリクルートし、抑制型のクロマチン構造を形成することで長期間にわたる潜伏感染状態を維持する。一方、生体内で潜伏ウイルスがどのように再活性化されるのかについては不明な点が多かった。われわれは、歯周病原菌の代謝産物である酪酸が HDAC 阻害効果を介してウイルスのクロマチン構造を「非活性化型」から「活性化型」に誘導することで潜伏 HIV と EBV を転写レベルで活性化することを見出した。歯周病原菌がレトロウイルスのみならず DNA ウイルスの複製にも影響を及ぼすことが明らかとなり、歯周病がウイルス感染症の進展に深く関与している可能性がある。また、同様の現象は口腔細菌のみならず腸管や女性生殖器に常在する酪酸産生菌においても認められたことから、これら異種微生物の感染による相互作用がウイルス感染症の病態形成に深く関与していると考えられる。口腔で見出された事実が広く全身にも共通することは、口腔疾患の重要性を再認識する必要性を示している。

現在、ウイルス再活性化後の宿主応答について詳細な解析を進めているが、口腔のウイルス研究を通して、エイズや EBV が関与する重度の歯周病、慢性関節リウマチおよび大腸性潰瘍炎等のウイルス性疾患発症機構が明らかとなることが期待される。

Y-4

エナメル芽細胞分化における Rho-kinase の役割

大津 圭史

岩医大 解剖 発生生物・再生医学

歯の発生において、エナメル芽細胞は分化する過程で核の極性と形態を変化させる。しかしこの一連の細胞変化を制御する細胞内分子調節機構については未だ不明な点が多い。本研究において我々は、Rho シグナル伝達経路の一分子である Rho キナーゼ (ROCK) が、エナメル芽細胞の分化とエナメル質形成に重要な働きをしていることを示した。

Rho シグナリングは細胞極性の維持、接着、移動、増殖、分泌、分化などさまざまな現象に関わっており、その中で特に Rho small GTPase のエフェクター分子 ROCK は、アクチン重合の制御を介し、細胞形態の維持に重要な働きをしていることが以前より知られていた。そこで、マウス切歯の器官培養、細胞培養を用いて ROCK がエナメル芽細胞分化とエナメル質形成にどのように関わっているかを検討した。

切歯の期間培養において、ROCK 阻害剤添加群では、エナメル芽細胞での極性の喪失、形態の異常が認められ、新たなエナメル基質の産生が抑制されていた。またこれらの細胞では、アクチン、E-cadherin,  $\beta$ -catenin の発現パターンに明らかな変化が生じていた。さらに培養エナメル上皮細胞を用いた実験において、ROCK はアクチン、E-cadherin,  $\beta$ -catenin の局在の制御を通じて細胞形態と接着、増殖を制御していることが明らかとなった。また、ROCK の 2 つのアイソフォーム ROCK1, ROCK2 に対する siRNA 実験によって、2 つのアイソフォームが相補的に働きながら、エナメル上皮細胞の細胞骨格、E-cadherin の発現を制御していることがわかった。

以上の結果から、ROCK はエナメル芽細胞の細胞骨格、細胞接着の制御を介してエナメル芽細胞の分化、エナメル質形成に深く関与していることが明らかとなった。

(講演時の会場内での聴衆による写真撮影や録音は禁止されております)

SL-1

『『はやぶさ』が挑んだ人類初の往復の宇宙飛行、  
その7年間の歩み』

川口 淳一郎

宇宙航空研究開発機構 シニアフェロー/宇宙科学研究所 宇宙飛行工学研究系 教授

【経歴】

宇宙工学者、工学博士。1978年京都大学工学部卒業後、東京大学大学院工学系研究科航空学専攻博士課程を修了し、旧文部省宇宙科学研究所に助手として着任、2000年に教授に就任。

2007年4月から2011年9月まで、月惑星探査プログラムグループプログラムディレクター(JSPEC/JAXA)、1996年から2011年9月まで、「はやぶさ」プロジェクトマネージャを務める。

現在、独立行政法人宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究所(ISAS/JAXA)宇宙飛行工学研究系教授、2011年8月より、シニアフェローを務める。

ハレー彗星探査機「さきがけ」、工学実験衛星「ひてん」、火星探査機「のぞみ」などのミッションに携わり、小惑星探査機「はやぶさ」では、プロジェクトマネージャを務めている。

【著書】

『人工衛星と宇宙探査機』(コロナ社)

『航空宇宙における制御』(コロナ社)

『ビークル』計測・制御テクノロジーシリーズ(コロナ社)

『はやぶさ、そうまでして君は～生みの親がはじめて明かすプロジェクト秘話』(宝島社)

『カラー版 小惑星探査機はやぶさ ―「玉手箱」は開かれた』(中公新書)

『「はやぶさ」式思考法 日本を復活させる24の提言』(飛鳥新社)

『閃く脳の作り方 飛躍を起こすのに必要な11のこと』(飛鳥新社)

CS-1

超高齢社会にむけたテロメア・マイクロRNAを用いた次世代診断・治療  
 田原 栄俊  
 広大院医歯薬保 細胞分子生物

超高齢社会をむかえる現代において、加齢に伴う細胞レベルでの変化を正確に理解し、それらの成果を抗加齢あるいは疾患のリスク回避・低減に結びつけることが重要である。我々は、加齢を理解する上で、*in vitro*の細胞培養系を用いた老化の研究を行い、細胞が老化する大きな要因として染色体末端に存在するテロメアの短縮、ストレスなどによるDNAダメージの寄与が重要であることを明らかにしてきた。1998年には、テロメアを延長させるテロメラーゼ遺伝子 TERT がクローニングされ、テロメラーゼ遺伝子を用いた細胞の不死化が可能になった。本講演では、TERT 遺伝子を用いた老化の回避あるいは不死化により、これまで基礎研究で用いることが困難であった様々な細胞の樹立が可能となり基礎研究の躍進に結びついている一端をご紹介したい。さらに、我々は老化のメカニズム解析を様々な視点から研究を行っている。一つは、ゲノムのエピゲノム変化であり、それらの変化はタンパク質をコードする遺伝子の発現変化をもたらすのみならず、ノンコーディング RNA の発現にも大きく寄与していることが明らかになってきた。ノンコーディング RNA の一つであるマイクロ RNA (miRNA) の発現は細胞老化とともにグローバルな発現変化が起こることも明らかになってきた。例えば、我々は、老化で発現が増加する miR-22 は、様々な線維芽細胞や上皮系の細胞に細胞老化の表現型を誘導する機能を持つことを明らかにした。しかも、miR-22 の発現は、多くのがん細胞株で発現が顕著に低下し、それらのがん細胞に miR-22 を強制発現させることでがん細胞に老化を誘導できることを明らかにした。つまり、正常細胞の老化で増加する miRNA は、がん化を抑制する機能を担っている可能性が考えられる。さらに、乳癌のゼノグラフトモデルでも miR-22 は腫瘍の増殖および転移抑制を示したことから、核酸医薬品の抗がん剤開発をめざしている。また、細胞内で合成されるマイクロ RNA の一部は、細胞外小胞の一つであるエクソソームの形で細胞外に放出されることが知られている。細胞老化におけるエクソソームについて、エクソソームの分泌量、エクソソーム中に含まれる miRNA 解析を実施するとともに、ヒト難治性がん患者の血液中に含まれるエクソソーム中マイクロ RNA を解析することで難治性がんの超早期診断への応用を試みている。本講演では、これらの最新の結果もあわせて紹介したい。

CS-2

老年期、衰退期を想定した基礎歯科医学の考え方  
 松下 健二  
 国立長寿医療研究セ 口腔疾患研究

超高齢社会のトップランナーである日本において、“長生きを喜べる社会の構築”は喫緊の最重要課題である。その課題解決のためには、立法や行政の努力だけではなく、多業種が連携し一致団結してその解決にあたるのが重要である。基礎歯学研究においても、このような課題解決のためにどのような貢献ができるかを常に意識しつつ、研究を進める必要がある。“長寿を享受するための理論的歯科学の推進”は、基礎歯学研究者に課せられた大きなミッションの一つである。

口腔は摂食、構音、味覚、表情を司る器官であり、長生きを享受するための極めて重要な機能を担っている。口腔の老化は、単に生命予後に影響するだけではなく、様々な老年病・老年症候群の発症や身体の機能障害の大きな要因となる。例えば、歯周病は、糖尿病、骨粗鬆症、心脳血管病、認知症、がんといった老年病との関連性が高い。そのため、両者の因果関係を明らかにすることは老年病対策のための重要な情報となるが、その解明には分子生物学や細胞生物学を駆使した基礎的な解析・研究が必須である。また、サルコペニア（筋力低下症）は高齢者の歩行困難や活動能力の低下の大きな原因になるが、口腔周囲の筋肉においても同様の現象が進行し、その結果咀嚼機能の低下や嚥下困難をきたして、低栄養や誤嚥の原因となりえる。しかし、その病態成立機序には不明な点が多く、今後推進すべき重要な研究テーマの一つであろう。さらに、老化による唾液分泌の低下は高齢者の QOL を著しく低下させるため、そのメカニズムの解明は喫緊の課題である。加えて、口腔における再生医学の確立とその応用は口腔機能の回復に多大なる貢献が期待されるが、そのためには基礎歯学研究者と臨床歯科医が連携してその基盤研究と応用研究を推進していく必要がある。このように、口腔における老化の分子基盤解明は、高齢者の健康維持に極めて重要な情報をもたらすとともに、その成果を臨床研究に繋げていくことで、長生きを享受することにおおいに貢献できるだろう。

健康寿命の延伸のためには、生活習慣病を予防することと、要介護にならないようにする介護予防の二つが重要である。この二つの予防を科学的根拠に基づいて実施して行くためには、老化に関する基礎研究を一層充実させ、一般社会に還元することが必要である。基礎歯学医学者はそのキーパーソンであり、今後その果たす役割はますます重要なものになっていくであろう。

CS-3

超高齢社会を見据えた咀嚼・嚥下の生  
理学

井上 誠

新大 院医歯 摂食・嚥下リハビリ

摂食・嚥下機能が低下した要介護高齢者、ことに嚥下障害者に対しては、これまで経管栄養などの代替栄養による延命を重視した医療が推進されてきた。近年、口腔ケアや摂食・嚥下リハビリテーションなどの重要性が社会に認知されてきたものの、これらの医療体系は十分なエビデンスに基づいて構築されたものとはいえず、多くは臨床報告や疫学調査に頼るにとどまっている。

嚥下障害に対するこれからの医療は、単に顎口腔顔面や咽頭、喉頭領域といった臓器別診療にとどまらずに、摂食・嚥下を全身機能として理解すること、さらに臨床・基礎研究の基盤整備を進める上では医学や食品科学などの異分野との交流を進めていくことが望まれる。咀嚼・嚥下は単純な運動機能ではなく、食欲、経験、嗜好などの上位脳による統合機能を含み、また呼吸、咳嗽などの関連する種々の機能をも巻き込んで、多くの神経・筋機構を共有している。咀嚼、嚥下、呼吸運動を観察したこれまでの研究では、相互の機能連関は決して強固なものではないといわれているが、咀嚼時の食塊咽頭流入に認められるように、実際には咀嚼機能が嚥下反射誘発やその活動パターンに何らかの変調を与えていることが報告されている。また、わたしたちは、健常時には意識することなく「咀嚼して」「息を止めてから」「飲む」行為を繰り返しているが、これらは半自動運動として随意性の制御が可能であるため、嚥下障害の臨床場面においては、上位脳で制御しながら経口摂取を進める＝考えて食べる、という非日常的な運動を患者に課さなければいけない。ヒトの摂食行動における上位脳の関与は、食べることを楽しみとして「生活の質」に直結させているヒトでしか評価できないことから、これからの摂食・嚥下機能の理解は末梢の神経・筋機構、咀嚼、嚥下、呼吸などの中枢が局在する下位脳幹などへのアプローチだけでは不十分と感じる。

「噛めば頭がよくなる」、「口腔機能の減退は認知症につながる」などといった短絡的なプロパガンダの時代は終わった。本シンポジウムでは、咀嚼・嚥下機能を感じ・運動の統合機能と見なして、基礎的理解を深めるための基礎的研究の中から、嚥下反射誘発の神経機構、咀嚼・嚥下の機能連関、咀嚼・嚥下運動時に重要な運動器官のひとつである舌運動機能に注目し、最近の知見を踏まえて紹介する。

MS1-1

Novel effects of salivary-bacterial  
interactions affecting oral biofilms

Frank A. Scannapieco

Dept. of Oral Biol., Sch. of Dent. Med.,  
Univ. at Buffalo, The State Univ. of  
New York, Buffalo

It is well known that salivary components interact with microbes to influence their colonization of the oral cavity. One such interaction involves the abundant salivary enzyme, amylase, which binds specifically and with high affinity to commensal oral streptococci that are early colonizers of the saliva-coated tooth and numerous in supragingival dental plaque. Amylase-binding streptococci (ABS) colonize only hosts with detectable salivary amylase activity suggesting that amylase interactions modulate oral colonization by ABS and have an evolutionary basis. The ABS *Streptococcus gordonii* produces two amylase-binding proteins (ABPs) [AbpA (20-kDa) and AbpB (82-kDa) of *S. gordonii*. The binding of amylase to this species is dependent only on AbpA in *S. gordonii* (and likely its homologs in other species), and not on AbpB. *In vitro* studies found ABPs to play a role in bacterial adhesion and biofilm formation. Interestingly, AbpA defective *S. gordonii* mutants were able to colonize rat mouths as well as the parental strains, suggesting that additional bacterial factors are involved in colonization and survival *in vivo*. In light of these findings, we considered potentially novel functions for these proteins. Preliminary studies suggest that amylase-binding to *S. gordonii* elicits differential gene expression in the bacterial cell. Microarray analysis of *S. gordonii* gene expression in response to the binding of salivary amylase revealed differential expression of a number of genes, particularly, the up-regulation of genes involved in fatty acid synthesis (FAS). In addition, changes in bacterial phenotype were evident including increased proliferation, and resistance to acidic conditions and the antimicrobial agent (triclosan). An *abpA*-deficient strain failed to bind salivary amylase and failed to produce a similar effect on gene expression and phenotype in response to exposure to salivary amylase. These results suggest that salivary amylase elicits differential gene expression and

phenotype adjustment of *S. gordonii* and that the AbpA protein could play a key role this observed effect.

Further studies assessed the role of starch and amylase in the regulation of AbpA expression. Previously, it was found that glucose regulates the expression of AbpA through catabolite repression. Recently, we provided evidence that *abpA* gene and the AbpA protein were both highly upregulated in *S. gordonii* in the presence of starch and amylase, as well as maltose/maltodextrin, products of starch degradation by the action of salivary amylase. Starch alone or amylase alone did not affect AbpA expression. These results suggest that maltose/maltodextrin plays a regulatory role in AbpA expression as a substrate induction mechanism in contrast to catabolite repression exerted by glucose.

Knowledge of saliva-mediated bacterial signaling pathways could have clinical application, for example by devising analog agents that serve as inhibitors or promoters of microbial colonization. Such agents may enable selective manipulation of bacterial colonization, and by extension, impact disease prevention or control. This knowledge could well extend beyond biofilm development in the oral cavity, with application to other microbial communities affecting systemic disease.

MS1-2

Individual variance of dental plaque maturation process related with oral health

Yoshihisa Yamashita

Sec. of Preventive and Public Health Dent., Div. of Oral Health, Growth and Development, Kyushu Univ. Fac. of Dent. Sci.

In the human oral cavity, microbial communities form biofilms on saliva-bathed tooth surfaces and matured dental plaque becomes causes of oral diseases, e.g. dental caries and periodontal diseases. However, course of the maturation remains uncharacterized using culture-independent molecular techniques. To explore a more 'healthy' pattern of dental plaque maturation, we focused on subjects without caries experience. Using a retrievable hydroxyapatite disk model, dental plaque samples accumulated for 1, 2, 3, 4, 5 and 7 days were collected from 9 caries-free young adults and 10 who have  $\geq 9$  teeth with caries experience ( $23 \pm 6$  years, 6 females and 13 males). Amounts of total bacteria were estimated based on quantitative real-time PCR using bacterial universal primers. The composition of developing bacterial community day-by-day was pursued by barcoded pyrosequencing analysis of 16S rRNA gene. In both caries-free and -active subjects, total bacterial amount and microbial diversity steadily increased over time. Total bacterial amount and species richness and diversity of bacterial community on the disk gradually increased during 7 days. Of 59 bacterial genera detected in this study, four genus including *Streptococcus* appeared to predominate during the early stages. On the other hand, anaerobes such as *Prevotella* become predominant in the late stage. In addition, some genus exhibited relatively large inter-individual variances, suggesting that these variances might be associated with the virulence of dental plaque biofilm. Plaque microbiota of caries-free subjects showed significantly lower bacterial amount but higher microbial diversity than caries-active subjects in the early stage of plaque development. *Neisseria* and *Gemella* of caries-free subjects were significantly more predominant especially in the early stage, whereas *Streptococcus*, that is the most predominant mem-



ber of the microbiota were present in less proportion. Furthermore, the relative abundances of such as *Granulicatella* less drastically increased in the late stage in caries-free subjects than caries-active subjects. The results in the present study revealed microbial developing pattern on hydroxyapatite surfaces in human oral cavity considering individual variance and a characteristic succession pattern of plaque microbiota development in caries-free subjects. It might lead to their low susceptibility to dental caries.

MS1-3

Metabolic modulation of caries-related biofilm —The process from symbiosis to dysbiosis—

Nobuhiro Takahashi

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

It is well known that oral biofilm consists of over 500 species of microorganisms and coexists with host human under harmonious healthy conditions (symbiosis); however, once the oral environmental balance is disturbed, oral biofilm may cause caries, periodontitis or halitosis (dysbiosis). Under these circumstances, it is not rational to define one microorganism as a pathogen of these oral diseases. Instead, the whole physiological activity of biofilm should be considered. Microbial metabolism is one of the major physiological activities of biofilm, especially concerning caries. Metabolic modification by and adaptation to the altered oral environment and a consequent microbial shift may occur during the process from symbiosis to dysbiosis.

Supragingival biofilm microbiota metabolize salivary components such as glycoproteins, resulting in acid production from the sugar chain of glycoproteins and alkali production from the amino acid chain of glycoproteins. These metabolic activities may keep the biofilm pH neutral. When sugar is supplied to the oral cavity, such as during a meal, the microbiota produce acid from the sugar and acidify the biofilm environment, resulting in demineralization of tooth surfaces. Prolonged and frequent acidification initiates caries formation. This environmental acidification may also modify microbial metabolism by pH regulation of metabolic enzymes and induce gene expression. It was reported that non-mutans streptococcal species (early colonizers of supragingival biofilm such as *Streptococcus sanguinis* etc) increase their lactic acid production under acidic conditions, due to the optimal acidic pH of lactic acid dehydrogenase, an enzyme responsible for lactic acid production. In addition, these oral streptococci increase their acid productivity and acid tolerance under acidic conditions through acid induction of acid-protective systems, including proton-translocating ATPase, alkali-producing metabolic pathways and stress

proteins (GroE, DnaK etc). Once the acidic environment is established by these bacterial metabolic activities in supragingival biofilm, acid selection may occur and more acid-producing/acid-tolerant bacteria, such as mutans streptococci, lactobacilli and bifidobacteria, may increase in number. This microbial shift may create cariogenic biofilm.

The environmental acidification of supragingival plaque seems to be inevitable, since healthy supragingival biofilm consists of saccharolytic bacteria, such as non-mutans streptococci and actinomyces; however, it is possible to prevent the process from symbiosis to dysbiosis through metabolic control of supragingival biofilm.

MS1-4

Host-microbial co-evolution in periodontitis associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Toshiyuki Nagasawa

Div. of Periodontol. & Endodontol.,  
Dept. of Oral Rehabil., Sch. of Dent.,  
Health Sci. Univ. of Hokkaido

Periodontitis is caused by the bacterial biofilm, which is composed of more than 800 bacterial species. Not all the bacteria are equally pathogenic, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) is frequently associated with aggressive periodontitis. In addition, *A. actinomycetemcomitans* has been also detected from the lesion of the non-oral diseases, such as infective endocarditis and brain abscess. Patients with some genetic neutrophil dysfunction (Kostman syndrome, Papillon-Lefèvre syndrome, etc.) are consistently suffered from severe periodontitis, and these patients are frequently infected with *A. actinomycetemcomitans*, suggesting that *A. actinomycetemcomitans* might infect the genetically susceptible hosts. JP2 is a highly pathogenic *A. actinomycetemcomitans* clone that has deletion in the leukotoxin promoter, and the deletion results in the production of large amount of leukotoxin. It was reported that individuals who carried the JP2 clone had a significantly increased risk of periodontal attachment loss. Based on the mutation of hemoglobin binding protein in JP2 clone, it was reported that the dissemination of the JP2 was skewed to some region and ethnic groups. The detection of JP2 had not been reported in East Asia, including Japan, Korea and China. Recently, we have isolated *A. actinomycetemcomitans* with JP2-type leukotoxin promoter in Japanese periodontitis patients, and those isolates did not have the same mutation in hemoglobin binding protein as JP2 clone. These results suggest that host-microbial co-evolution might exist in the *A. actinomycetemcomitans*-associated periodontitis, and examination of the co-evolution might be relevant for the molecular diagnosis and treatment of the *A. actinomycetemcomitans*-associated periodontitis.

SS1-1

歯髄幹細胞による免疫療法  
山座 孝義  
九大 院歯 口腔常態制御 分子口腔  
解剖

2000年、ヒト成人歯髄組織に由来する幹細胞 dental pulp stem cells (DPSCs) が単離同定された (Gronthos *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA)。現在までに実に様々な歯および口腔組織に由来する間葉系幹細胞が発見されてきた。つまり、脱落乳歯歯髄より stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) (Miura *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003)、歯周靭帯より periodontal stem cells (PDLSCs) (Seo *et al.*, Lancet, 2004)、歯根根尖乳頭組織 stem cells from apical papilla (SCAP) (Sonoyama *et al.*, PLoSOne, 2006)、歯肉結合組織より gingival derived mesenchymal stem cells (GMSCs) (Zhang *et al.*, J. Immunol, 2009) が単離されている。現在ではこれら歯および口腔組織に由来する幹細胞の幹細胞学的特徴が明らかとされ、またこれら幹細胞を応用した再生医療も検討されている。

最近では、骨髄間葉系幹細胞を中心とした間葉系幹細胞が免疫細胞と反応し、免疫反応を制御するという驚くべき新たな機能が解明されてきた。歯および口腔組織に由来する幹細胞についてもこの免疫制御能力が備わっていることが報告されている。本シンポジウムでは、歯髄に由来する幹細胞に注目し、その幹細胞学的特徴や免疫学的特徴について紹介し、さらに歯髄の幹細胞による免疫学的細胞療法を応用した再生療法への可能性について発表する。

SS1-2

Differentiation of dental pulp stem cells to multiple types of tissue  
Nikolay Ishkitiev, Ken Yaegaki  
Nippon Dent. Univ. Dept. of Oral Health

Dental pulp is proven to harbor number of nondifferentiated mesenchymal stem cells. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) and adult dental pulp stem cells (DPSC) show extensive proliferative capacity and are suggested to have a potential for multilineage differentiation. We assessed the capacity for osteogenic, adipogenic, hepatogenic, cardiogenic and pancreatic differentiation of CD117-positive SHED and DPSC in SFM. Mesenchymal cells from deciduous and wisdom tooth pulp were isolated, and CD117-positive DPSC or SHED was separated using magnetic activated cell sorter. Cells were characterized using known stem-cell markers. The cells were then divided and subjected to osteogenic, adipogenic, hepatogenic, cardiomyogenic and pancreatic differentiation serum-free media. After 3-4 weeks of differentiation both cultures demonstrated osteogenic and adipogenic differentiation. Both cultures proved to be able for hepatic differentiation: cells demonstrated almost one hundred percents of cells positive for  $\alpha$ -fetoprotein, albumin, hepatic nuclear factor 4 $\alpha$ , insulin-like growth factor 1 and CPS-1 after hepatic differentiation. Moreover we found that it would be possible to produce half billion hepatocyte-like cells required for human transplantation. The concentration of urea in the media increased. Moreover, glycogen was found in the cells' cytoplasm. After the pancreatic differentiation the expression of endocrine markers insulin, glucagon, somatostatin and pancreatic polypeptide, GLUT2, and the exocrine marker pancreatic amylase were found positive by immunocytochemistry, flow-cytometry or RT-PCR. Real time RT-PCR revealed the expression of pancreatic specific transcription factors: PDX1, HHEX, MNX1, NEUROG3, PAX8, PAX6 and NKX6-1. After cardiac differentiation immunocytochemical tests were positive for GATA binding protein 4, Nk2 transcription factor related locus 5, desmin and cardiac Troponin T. Analysis with real time RT-PCR also showed significant increase in

the expression of BMP-2, BMP-4, BMPR1A, MEF2C, MYH7B, SMAD1 and SMAD5, which are transcription factors are associated with mature cardiomyocytes.

The dental mesenchymal cell cultures grown in SFM acquired morphological and functional characteristics of osteoblasts, adipocytes, hepatocytes, pancreatic cells and cardiomyocytes. Multilineage differentiation of dental pulp stem cells in medium without animal products can bring *in vitro* cell differentiation methods closer to clinics.

SS1-3

歯髄組織からの神経再生

山本 朗仁

名大 院医 頭頸部感覚器外科

中枢神経は脊髄損傷、脳梗塞、神経変性疾患などにより深刻なダメージを受ける。その病態は複雑であり、有効な治療法が未だ開発されていない。我々は、ヒト歯髄幹細胞を用いた難治性神経疾患治療の開発を目指してきた。ヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) や智歯由来の永久歯歯髄幹細胞 (DPSC) は、高い増殖能と多分化能を示す神経堤由来の細胞集団である。自己由来の成体幹細胞であるため、移植安全性が高く、倫理的問題も極めて少ない。本発表では、「ラット脊髄損傷モデル」や「マウス新生児低酸素脳症モデル」を用いた「歯髄幹細胞の難治性神経疾患に対する治療有用性」を紹介するとともに、歯髄幹細胞のもつ驚異的な神経再生能力を概説する。

我々は、完全切断したラット脊髄にヒト歯髄幹細胞を移植すると下肢運動機能が回復することを見いだした。骨髄間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞にはこのような活性を見いだせない。詳細な解析から、移植した歯髄幹細胞は3つの神経再生効果を発揮することを見いだした。(1) 損傷後の様々な脊髄細胞のアポトーシスを強く抑制する神経保護効果。(2) 損傷した中枢神経が産生する「多様な軸索伸張阻害因子」の機能抑制による軸索再生効果。(3) 移植した脊髄損傷環境下でオリゴデンドロサイトに特異的分化することによる細胞補給効果。重要なことに治療効果(2)および(3)は他の生体幹細胞では報告のない、歯髄幹細胞に特異的な神経再生能力であった。

さらに、我々は歯髄幹細胞の無血清培養上清 (CM) の持続投与のみでも脊損ラットの下肢運動機能が著しく改善することを見いだした。歯髄幹細胞-CM は(1)、(2)の効果に加え、(4) 活性化ミクログリアの形質変換によって、損傷後の過剰な炎症反応を抑制し、組織再生環境を生み出す炎症制御効果を発揮することを見いだした。また、この歯髄幹細胞-CM (2 $\mu$ l) を1回、マウス新生児低酸素脳症モデルに脳損傷後24時間で脳内投与すると、生存率や運動機能が著しく改善することも見いだした。これらの研究成果は、歯髄幹細胞-CM が多様な神経疾患に治療効果を発揮することや、「細胞移植を伴わない、安全性の高い新しい再生医療の開発」に有用であることを示している。

SS1-4

ヒト歯髄由来間葉系細胞から induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) の樹立

本田 雅規, 鳥海 拓, 佐藤 桃子,  
磯川桂太郎  
日大 歯 解剖 II

歯髄組織中の間葉系幹細胞は線維芽細胞と象牙芽細胞に分化し、象牙質-歯髄複合体を維持している。また、実験的には骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨細胞への分化能を有している。一方で、骨髄由来の間葉系幹細胞は、胚葉を超えた分化能、免疫あるいは炎症反応の抑制能を示し、iPS 細胞の細胞源としても有用であることが示されている。したがって、歯髄組織の間葉系幹細胞にも同様な特徴が期待され、この観点に立って本シンポジウムを企画した。

発表前半では、歯髄組織に由来する間葉系幹細胞についての概説を、後半はヒト歯髄組織に由来する間葉系幹細胞からの iPS 細胞樹立について概説する。

具体的には、永久歯、乳歯さらには過剰歯の歯髄組織内にも間葉系幹細胞の存在が報告されているが、これらを比較・検討した報告は少ない。そこで、今回、過剰歯 5 検体の歯髄組織から細胞を単離し、永久歯・乳歯と比較解析した。

また、ヒト乳歯歯髄組織に由来する細胞から iPS 細胞の樹立に成功した自験例で、歯髄組織の部位差による樹立効率の差異についてその概要を報告する。

SS2-1

顎下腺の発生と再生における介在部導管の役割 —熱ショックタンパク質 Hsp27 の局在と変動—

天野 修<sup>1)</sup>、溝部 健<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> 明海大 歯 解剖、<sup>2)</sup> 明海大 歯  
オーラルリハビリ

介在部導管は古くから唾液腺の幹細胞といわれてきたが、現在まで定説となるような具体的な実験結果は残念ながら得られていない。しかし、最近の再生医学を目指した実験で、幹細胞のマーカーなどが同部に発現するなど、ようやく進展の兆しがみえてきた。Hsp27 は熱ショックタンパク質として熱やアルコール、重金属などの刺激によって細胞が障害され、アポトーシスに陥るのを防ぐ役割(抗アポトーシス)をもつほか、生理的条件下でも、増殖から分化への促進やアポトーシスの抑制に働くと考えられている。本講演では、ラット顎下腺の発生や再生、さらに種々の外科的な刺激に対する同タンパクの変動のデータを紹介し、唾液腺における介在部導管の役割について考察する。

ラット顎下腺の発生では、生後 2 週以降、腺房部の中心に強い発現が局在し、周囲の腺房細胞からは発現が消失した。免疫電顕および組織化学的に、胎生期の終末部を構成する terminal tubule (TT) 細胞が Hsp27 を発現していた。生後 4 週齢では Hsp27 陽性細胞は減少するが、腺房細胞分化を促進する isoproterenol の連続投与で促進された。Hsp27 陽性細胞は、アポトーシスに陥った TT 細胞の他、腺房細胞に分化し始めた細胞 (proacinar cell) と、顆粒をもった介在部導管細胞に認められた。無顆粒の介在部導管細胞には Hsp27 の局在はみられなかった。成獣では顆粒をもつ介在部導管細胞だけに Hsp27 の発現が残存した。

導管結紮・解除実験では、結紮により導管様構造物だけで構成された上皮組織に Hsp27 は認められなかったが、発芽状の突起が生じると Hsp27 が発現し、発芽が成長するとその基部に Hsp27 が局在した。腺房の形態が回復すると、介在部の一部に Hsp27 は限局した。また、増殖細胞の減少に伴って Hsp27 陽性細胞が増加し、その減少に伴って分化マーカーが増加した。

さらに、導管結紮の他、半分切除および全摘術を行い、術側および対側の顎下腺における Hsp27 の局在を調べると、形態的には全く変化が認められない対側で Hsp27 を発現する細胞が急増することが分かった。また、それらは全て介在部に限局していた。Hsp27 の局在変動を指標にした研究の結果か

ら、介在部導管には胎生期の腺房細胞への分化する胎生期 TT 細胞から由来する細胞を含み、障害を受けて腺房細胞へ分化することが分かった。また Hsp27 が介在部導管の増殖から分化への移行を促進または調整することが示唆される。

SS2-2

ドライマウス病態モデルとしての *E2f1* 欠損型 NOD/SCID マウスの可能性

佐藤慶太郎<sup>1)</sup>、成田 貴則<sup>2)</sup>、福島美和子<sup>3)</sup>、伊藤 龍郎<sup>4)</sup>、泉福 英信<sup>5)</sup>、杉谷 博士<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>獨協医大 医 生理、<sup>2)</sup>日大 生物資源 獣医生化、<sup>3)</sup>日大 松戸歯 生理、<sup>4)</sup>日大 松戸歯 小児、<sup>5)</sup>感染研 細菌 I

口腔乾燥症（ドライマウス）は唾液分泌低下を主訴とする病態の一つであり、深刻な QOL の低下をもたらす。ドライマウスの病態解析や治療法開発を目的とした病態モデルマウスが研究に用いられている。非肥満性糖尿病（NOD）マウスはシェーグレン症候群に似た病態を呈し唾液分泌低下を引き起こす。さらに、転写因子である *E2f1* 遺伝子をノックアウトした *E2f1* 欠損型 NOD マウスは NOD マウスより顕著な唾液分泌低下を示すが、糖尿病を併発するため唾液分泌低下の原因を特定するのが難しい。今回、重度免疫不全（SCID）化により糖尿病を発症しない *E2f1* 欠損型 NOD/SCID マウスを作製し、ドライマウスの病態と唾液分泌低下のメカニズムを検討した。

唾液分泌量は、ピロカルピン腹腔内投与により口腔内へ分泌された唾液の重量を測定した。行動解析は、絶食後に飼料を与えた時の飲水行動をビデオ撮影して行った。唾液腺の組織学的な検討は、HE 染色により行った。水チャネルである AQP5 の唾液腺における発現の検討はイムノプロット法により、局在の検討は免疫組織化学により行った。ユビキチン化した AQP5 の検出は免疫沈降法とイムノプロット法により行った。

*E2f1* 欠損型 NOD/SCID マウス（変異マウス）群ではピロカルピン刺激による唾液分泌量が NOD/SCID マウス（対照）群に比べ低下していた。ビデオ解析より、固形飼料摂餌時の飲水回数は変異マウス群の方が対照群に比べ増加していた。水分を多く含むペースト状の飼料摂餌時の飲水回数は差が認められなかった。以上より、*E2f1* 欠損型 NOD/SCID マウスは唾液分泌低下により乾燥固形飼料の摂取が困難になり、ドライマウスの病態を呈することが示唆された。組織学的には、変異マウス群では対照群に比べ臓器における腺房細胞の占める割合が低下していた。また、腺房細胞のマーカータンパク質である AQP5 の発現が低下していた。共焦点レーザー顕微鏡で AQP5 の細胞内局在を検討したところ、腺

腔側膜に局在する対照群と異なり、変異マウス群では腺腔側膜から細胞質へ拡散していた。さらに変異マウス群の顎下腺の AQP5 では、ユビキチン化が認められた。以上より、*E2f1* 欠損型 NOD/SCID マウスは唾液腺における AQP5 の一部がユビキチン化し、分解が促進され腺房細胞における発現レベルが低下することが示唆された。水分泌に重要な AQP5 の発現レベルの低下が、唾液腺に占める腺房細胞の割合の低下と相まって、*E2f1* 欠損型 NOD/SCID マウスの唾液分泌低下を引き起こすと考えられる。

SS2-3

ブリーチング法を利用したエナメル質  
表層下脱灰病巣の再石灰化戦略

向井 義晴<sup>1)</sup>、飯塚 純子<sup>1)</sup>、高垣 裕  
子<sup>2)</sup>、寺中 敏夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>神歯大 口腔治療 保存修復、<sup>2)</sup>神歯  
大 生体機能 生化・分子生物

【研究目的】 エナメル質表層下脱灰病巣を形成している表層にはサブミクロンレベルの孔や裂溝が存在し、病巣体部に侵入したタンパク質等の有機物が着色の原因となるのみならず、再石灰化の進行を妨げている可能性が報告されている。我々はエナメル質表層下脱灰病巣に侵入している有機物を分解し、効果的な再石灰化を誘導するための手段の1つとして、オフィスブリーチング剤の有効性を検討し、134回学術大会において、安静時唾液から抽出した唾液タンパク質に対し HiLite 処理を模した条件下で30% 過酸化水素水を作用させると特定のタンパク質が断片化される一方で高分子量の新たな反応物が生成されることを報告した。しかしながら、表層下脱灰病巣部に侵入していると考えられる唾液タンパク質とブリーチング剤との反応は未だ不明である。そこで本研究では、ウシエナメル質に表層下脱灰病巣を作製し、安静時唾液に浸漬することで唾液タンパク質を侵入させ、HiLite 処理の有無による病巣侵入唾液タンパク質の変化を検討した。

【材料および方法】 ウシ下顎中切歯よりエナメル質片を切り出し、3×4mm の平坦な面を作製した。その後、耐水研磨紙 2000 番で研磨を行った。耐酸性パーニッシュにて試験面を 2×3mm に規定し、エナメル質片を脱灰溶液 (0.1M acetic-acid, 1.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 4.6) に 37°C で 4 日間浸漬し表層下脱灰病巣を作製し、以下に示す 2 群に分けた。1) Lesion 群：エナメル質片に表層下脱灰病巣を作製した後、自己安静時唾液に 37°C で 5 日間浸漬した。唾液は氷冷しながら採取し、0.02% の NaN<sub>3</sub>を加えて用いた。また、1 日 1 回新鮮な唾液と交換した。2) HiLite 群：Lesion 群と同様に病巣を作製後、安静時唾液に浸漬した。その後、HiLite を 9 回適用した。これらの処理後、試料表面に付着した唾液等を取り除くため氷冷 Na リン酸緩衝液 (20mM PB, pH6.8) にて洗浄した。洗浄後、0.15M NaCl 含有 PBS、0.4M PB (pH6.8)、1N HCl を用いて病巣内のタンパク質を順次抽出し、それらを透析、濃縮後、SDS sample buffer に溶解し、94°C、5 分熱変性処理した。回収されたタンパク質は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて分析し、安静時唾液中のタンパク質と比較した。

【結果】安静時唾液に浸漬した表層下脱灰病巣から抽出した試料は、安静時唾液中のタンパク質のパターンと比較すると、低分子量のタンパク質に限られていた。またタンパク質染色により Lesion 群と HiLite 群を比較すると、HiLite 群では大幅に消失・減少していることが確認された。

【考察】安静時唾液に浸漬した表層下脱灰病巣から抽出した試料と、安静時唾液中のタンパク質試料の電気泳動パターンを比較すると、類似はあるものの、一部のみ回収されたことから、表層下脱灰病巣内には選択的に唾液タンパク質が結合していると考えられた。また、Lesion 群と比べ、HiLite 群では大幅にタンパク質が消失・減少したことから、表層下脱灰病巣内に侵入した唾液タンパク質は HiLite 処理により切断・変性したと考えられた。

【結論】表層下脱灰病巣には選択的に唾液タンパク質が結合し、オフィスブリーチング剤である Hi-Lite を作用させると、特定のタンパク質が断片化されることが示された。

SS2-4

唾液から「がん」が発見できる時代へ  
—歯科医療の拡大を目指した新規唾液  
検査の開発—

槻木 恵一

神歯大 院歯 環境病理

【背景】唾液検査は歯科医療に古くから導入され、歯科疾患の病態把握に広く利用されてきたが、近年、歯科会以外から唾液を用いた検査に注目が集まっている。これは唾液であれば簡単に集めることができ、「痛くない・怖くない・長くない」医療を実現し、癌を初めとする様々な全身疾患を早く見つけられるかもしれないからである。さらにこの唾液検査は、疾患の発見だけでなくストレス測定、疲労度測定、体調管理、環境汚染の暴露度などへの応用も検討されており、今後唾液検査は大きな広がりを見せていく分野であると考えられる。しかし、多くの企業が興味を示しているにもかかわらず、実用化を目前に入れた研究成果は多くない。これは、唾液検査に関する専門家が少ないことも一因として挙げられる。一方で、唾液腺に関する教育は、歯学部以外ではほとんど行われていないので、唾液や唾液腺の専門家は歯科医師であり、全ての唾液検査のプライオリティーを確保できる位置にいる。すなわち、唾液検査の進展は歯科医療の拡大につながる可能性を秘めていると言える。そこで本演題では、当教室で行われた前立腺癌腫瘍マーカー PSA の唾液検査への応用に関する研究成果を報告する。

【目的】 Prostate Specific Antigen (PSA) は前立腺特異抗原であり、分子量 34,000 の糖蛋白である。生体内において前立腺上皮細胞で産生され血中に微量に漏出しているが、前立腺癌では前立腺組織の破壊が生じ多量に血中に漏出することにより血中濃度の上昇をきたす。この現象により PSA は前立腺癌に特異性の高い腫瘍マーカーとされ、癌検診などで広く用いられている。一方、唾液は血液から産生されることから血液成分を反映することが知られており、唾液を用いた検査に注目が集まっている。そこで、本研究では、従来行われてきた PSA の血液検査について、簡便かつ侵襲性の少ない唾液検査へと代替可能であるかについて検討した。

【方法】 PSA 産生前立腺癌培養細胞株 LNCap を免疫不全マウス (SCID マウス) 7 匹に移植した。この際、移植細胞数は  $10^6$  (n=2)、 $10^7$  (n=3)、 $10^8$  (n=3) の 3 種類行った。次に、血清濃度、顎下線組織内濃度、唾液 PSA 濃度について ELISA を用いて測定し、統計学的に比較検討を行った。

次にヒトにおいて前立腺癌と診断され、ホルモン



療法中およびホルモン療法後のフォロー中の患者 31 人の唾液と血液採取を行い、ELISA を用いて PSA 濃度の測定を行った。さらに、PSA 血清濃度が 2.5ng/mL 以上を高 PSA 値群とし、この患者群において血清 PSA 濃度と唾液 PSA 濃度の相関について統計的に比較検討を行った。PSA 血清濃度が 2.5ng/mL 未満を低 PSA 値群とした。

さらに、ヒト 3 大唾液腺における PSA mRNA の発現を RT-PCR 法で検討した。

[結果] マウスは PSA 遺伝子を持たないことから、コントロールマウスにおける PSA は全ての実験において検出されなかった。一方、担癌マウスの血中 PSA 濃度は腫瘍の大きさと相関関係が認められた。また血中 PSA 濃度に依存して顎下腺組織内の PSA 濃度も上昇した。唾液中 PSA についても明らかな濃度の増加が認められた。

ヒト前立腺癌患者では、血中 PSA 高値群と低値群の唾液 PSA 濃度に有意差が認められた。また、血中 PSA 高値群では、血中 PSA 濃度と唾液 PSA 濃度には相関関係が認められた。

さらに、ヒト 3 大唾液腺には PSA mRNA は検出されなかった。

[まとめ] マウスによる実験において、腫瘍産生性の PSA は血液から唾液腺に移行し、最終的に唾液中にも分泌されることが明らかになった。また、血中濃度の増加に依存して唾液腺 PSA 濃度が増加することが明らかになった。

ヒト唾液腺では PSA は mRNA レベルで産生が認めないことから、唾液中に検出された PSA は血液からの移行であることが考えられた。また、転移や再燃している PSA 値 2.5ng/mL 以上の患者群で、血中 PSA 濃度と唾液 PSA 濃度の統計的に相関が得られた。

本研究において、唾液 PSA 検査が前立腺癌の発見に有用である可能性が示唆された。

SS3-1

口腔領域における iPS 細胞研究の現状と展望

原田 英光<sup>1)</sup>、江草 宏<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>岩医大 解剖 発生生物再生医学、

<sup>2)</sup>阪大 院歯 顎口腔機能再建 歯科補綴一

概要：iPS 細胞は成体組織の細胞から作製できる多能性幹細胞であり、倫理的問題をクリアできる細胞として難治性疾患の原因究明や治療法開発の in vitro モデル、さらには再生医療などへの応用が期待されている。口腔領域に関する研究では、口腔が比較的細胞を採取しやすい場所であると同時に iPS 細胞を作製する上で作製効率の高い組織が多く存在することや、歯や歯周組織の再生に iPS 細胞を用いる試みが発表されている。iPS 細胞は、日本から発信された世界的研究の一つでありながら、国際的にも競争の激しいテーマとなっており、日本が取り残されていくのではないかと危惧されている。その中で、日本から発信している口腔領域での iPS 細胞研究は、世界的にも注目を浴びており、また歯の再生は、iPS 細胞による器官再生の先駆けとなることが期待できる。このような背景から、iPS 研究の現状を総括すると共に、口腔組織の特殊性を考慮した iPS 細胞の作製に関する技術から iPS 細胞を口腔組織の細胞に分化誘導する技術についての研究内容を発表していただき、歯科医学における iPS 細胞研究に関する現状と将来展望を議論してもらおう。本シンポジウムが、国民的知名度のある iPS 細胞研究を通じて、歯学研究を活性化の一助となることを期待している。

SS3-2

再生医療を見据えた人工多能性幹細胞樹立及び培養システムの開発—異種成分を含まないコンディションでのヒトiPS細胞樹立

三浦 巧、町田 正和、細田 明広、大倉 隆司、梅澤 明弘、阿久津英憲  
国立成育医療研究センター研 再生医療セ

ヒト細胞を異種成分にさらすことは、非ヒト病原体の感染や移植細胞の免疫拒絶といったリスクを増大させるため、安全にiPS細胞を再生医療へ応用するには、培養試薬から異種成分を除去する必要がある。そこで、本研究では、ヒトiPS細胞樹立の段階から異種由来物の影響を排除するために、フィーダー細胞としてヒト組織由来フィーダー細胞を樹立し、異種由来成分を排除したヒトiPS細胞培養液の確立および異種成分を使用しない細胞継代法の開発を行った。次に、この完全ヒト型培養システムを用いて、ヒトiPS細胞を樹立し、長期間培養（少なくとも50継代以上）したところ、未分化状態を維持したまま安定に培養することが可能であることが観察された。更に、異種由来物を排除した培養環境のヒトiPS細胞に与える長期的な影響を評価するために、染色体核型解析によりゲノム安定性を解析した結果、すべてのヒトiPS細胞において異常は認められなかった。また、細胞特性評価に関して、ヒトES細胞未分化性維持と多分化能性の保持について解析を行った結果、未分化マーカーの発現はRT-PCR法および免疫組織化学法により陽性であることが確認できた。さらに、これらヒトiPS細胞はテラトーマ形成能を有しており、分化多能性を十分に保持していることも判明した。この完全ヒト型培養システム下で培養されたヒトiPS細胞には、移植医療の際の免疫拒絶反応を誘引する可能性がある動物由来のシアル酸 (Neu5Gc) の混入がないことも見いだした。さらに、このヒトiPS細胞は異種成分を除去した培養環境下においても、神経系細胞へ分化することが観察された。以上の結果より、本研究で開発した完全ヒト型培養システムは、安全で高品質なヒト幹細胞再生医療を提供する基盤作りに大きく貢献できるものと確信している。

SS3-3

歯肉由来iPS細胞の歯科医学への応用  
江草 宏  
阪大 院歯 顎口腔機能再建 歯科補綴一

人工多能性幹細胞 (iPS細胞) は、体細胞に数個の遺伝子を導入することでその記憶を初期化した多能性幹細胞である。口腔粘膜の歯肉は歯科治療の過程で切除される機会の多い組織であり、一般的に切除歯肉は廃棄されている。我々は、歯肉を用いることで、容易に質の高いiPS細胞が樹立可能であることを見出した。また、歯肉線維芽細胞の初期化効率は、従来iPS細胞作製に用いられている皮膚線維芽細胞と比較して高く、この細胞を用いることで癌遺伝子c-Mycあるいはウイルスベクターを用いずにiPS細胞が樹立可能であることを明らかにしている。

歯肉から樹立したマウスiPS細胞は成熟した骨芽細胞への分化能を示し、化合物ライブラリースクリーニングにより得た骨芽細胞分化促進化合物を用いることで、腫瘍化を回避しながらその分化をより確実に誘導することが可能であった。また、ヒト歯肉線維芽細胞は、iPS細胞の未分化維持培養に必要なフィーダー細胞として機能することが明らかとなり、従来のiPS細胞の培養に用いられているマウス由来のフィーダー細胞の使用を回避する方法として注目している。

採取およびその初期化誘導が容易な歯肉線維芽細胞から作製されたiPS細胞は、将来的にはさまざまな組織の再生医療への応用が期待されるだけでなく、Personalized Dentistryに必要な病態・個体差解明、新薬探索、毒性評価などの技術開発に有用なツールとなる可能性がある。本発表では、歯肉由来iPS細胞の樹立およびその歯科医学への応用について言及しつつ、今後の課題と将来の展望について考察したい。

SS3-4

口腔組織からの iPS 細胞の作製とその  
歯科領域への利用（小児歯科の観点から）

齊藤 一誠  
新大 小児歯

歯科臨床において、上下顎 20 本もある抜去乳歯は子どもの記念に保存する以外はほとんど廃棄されてきたが、近年の再生医療研究の隆盛に伴い、抜去乳歯の有効性が注目されている。そこから歯髄幹細胞が豊富に得られるのではないかと、それをオーダーメイド医療として利用できないか（teeth bank）という見方が広まり、抜去乳歯の効率的な利用性、応用性が検討されている。しかし、歯髄幹細胞の有効利用には障害がいくつか存在する。脱落直前の乳歯から取得できる歯髄細胞は僅かであり、また口腔細菌感染の可能性があることから、初代歯髄細胞を良好に培養する系が整っていない。歯髄幹細胞の数の問題は、それを iPS 細胞化すれば解決できる可能性がある。実際、永久歯歯髄細胞からの iPS 化は既に岐阜大で達成されている。この成果は、研究面で興味深い知見をもたらした。即ち、表皮線維芽細胞に比べ、歯髄細胞からは  $10^3$  倍ほどの高率で iPS 細胞が得られたという点である。歯髄細胞は線維芽細胞に比べ、分化程度が低く、幹細胞に近い性質を持つ細胞集団で構成されていると考えられる。分化程度が低い幹細胞は、一般的に iPS 化され易いとされるからである。

我々は乳歯歯髄細胞からの iPS 細胞樹立の可能性を検討してきた。まず、被験者数名から初代乳歯歯髄細胞を単離した結果、被験者によって細胞増殖速度は変化に富んでいた。また、幹細胞マーカーの一つとされるアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を検索したところ、個々での差が大きく、細胞増殖が速い細胞は ALP 活性も高かった。興味深い結果として、ALP 活性の高い細胞では iPS 細胞の樹立効率が高くなることが示された。

今回は乳歯歯髄細胞の特性についてこれまで得られた結果を紹介するとともに、乳歯を用いた iPS 細胞作製への取り組み、更に iPS 細胞から歯組織再生へ向けた将来計画について講演させていただく予定である。

SS3-5

iPS 細胞から象牙芽細胞への分化誘導  
技術の開発と歯の再生への応用

大津 圭史  
岩医大 解剖 発生生物再生医学

現在まで、乳歯歯髄、歯根膜、マウス切歯などに存在する幹細胞の発見や、胎生期歯胚再構成などの組織工学技術の進歩によって、機能的な歯の再生の可能性が示されてきている。しかしながら、ヒトの歯の再生を考えた場合、成体組織から高純度で十分な数の幹細胞を獲得することは技術的に困難であり、また胎生期の歯胚細胞を使用することは倫理上大きな問題を伴う。

これらの問題を解決するために我々は、自身の細胞から樹立可能で、高い増殖能を持つ iPS 細胞（人工多能性幹細胞）に着目して歯の再生研究を行っている。具体的なプロジェクトとして、iPS 細胞から象牙芽細胞や、歯周組織を構成する細胞を獲得するために、その前駆細胞である神経堤細胞（NCLC）への分化誘導技術の開発を行い、そこから目的とする細胞を獲得することを目指している。

現在までに、iPS 細胞は、細胞凝集塊（スフェロイド）を形成させた後、神経分化培地で培養することで効率よく NCLC に分化誘導できることがわかった。そしてこの細胞は軟骨、脂肪、骨細胞などへの分化能を有し、マウスの皮下に移植しても奇形種をつくらない安全性の高いものであった。さらに NCLC は歯胚上皮と共培養することによって歯原性間葉細胞、さらに象牙芽細胞に分化することが明らかとなり、将来この細胞が歯の再生に有用である可能性が示唆された（Otsu *et al.* Stem Cells & Development, 2012）。本講演ではこれらのデータを示しながら iPS 細胞をどのように歯の再生に応用していけばよいか、今後の展望も含め議論したい。

SS3-6

iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化誘導技術の開発と歯の再生への応用  
新垣真紀子  
東北大 院歯 小児発達歯

歯胚は、発生初期から歯原性上皮細胞と間葉細胞間の相互作用により、複雑な歯胚形態形成が行われ、最終的にはエナメル芽細胞、象牙芽細胞への分化により硬組織形成が行われる。歯の発生・再生研究では、歯髄幹細胞などから象牙芽細胞やセメント芽細胞を分化誘導する手法が報告されている。その一方で、エナメル芽細胞の分化メカニズムは未だ明らかになっていない点も多く、人為的な分化誘導法も確立していない。

そこで我々は、多分化能と自己増殖能をもつ iPS 細胞に着目し、マウス iPS 細胞とラット歯原性上皮細胞株 SF2 の中でもアメロプラスチン (Ambn) 高発現の SF2-24 との共培養系を用いて、iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化誘導を試みた。共培養後 7 日目において、iPS 細胞における CK14 と p63 の発現上昇が認められ、さらにエナメル芽細胞マーカーである Ambn、エナメリンの発現開始を認めた。さらに、共培養 14 日目の上皮細胞様に分化した iPS 細胞集団において、AMBn 特異抗体を用いた免疫細胞染色法により、AMBn タンパクの発現を確認した。これらの結果から、iPS 細胞を Ambn 陽性エナメル芽細胞へと分化誘導することに世界で初めて成功したといえる。またこの分化過程において、SF2-24 が分泌する Ambn、Neurotrophin-4 (NT-4) および BMP 分子群が、上皮細胞からエナメル芽細胞への分化において極めて重要な役割を演じていることが明らかとなった。これらの成果から、全身どこの細胞からも、エナメル上皮を誘導できる可能性が示唆されたことから、小児における交換期乳歯歯髄細胞を用いて、iPS 細胞化と再生医療への応用を検討している。

SS4-1

疾患発症へのエピジェネティックスの関与—口腔の炎症性疾患とエピジェネティックス—  
安彦 善裕  
北医大 歯 生体機能・病態学系 臨床口腔病理

【疾患発症へのエピジェネティックスの関与—基礎から口腔疾患の最前線—の企画にあたり】

エピジェネティックスは DNA の塩基配列を伴わず遺伝子発現が変化する減少であり、組織発生や様々な疾患への関与が示唆されてきている。これまで、主に悪性腫瘍の発生に関わるエピジェネティックス修飾について検討されてきたが、最近になり、先天性疾患と悪性腫瘍以外の後天性疾患、すなわち、糖尿病を初めとした代謝疾患、アレルギー疾患、免疫疾患、神経変性疾患、微生物感染などでのエピジェネティックスに関する報告がなされてきている。口腔領域でのこれらについての報告は未だ僅かであるが、今後、口腔領域でもエピジェネティックスは疾患理解のための重要な位置づけになるものと思われる。そこで今回、「疾患発症へのエピジェネティックスの関与」と題してシンポジウムを企画し、第一線で御活躍の先生方に御登壇頂くこととした。

【口腔の炎症性疾患とエピジェネティックス】

口腔領域では、悪性腫瘍発生に関わるエピジェネティックス修飾の報告は比較的多いものの、他の疾患への関与については僅かである。口腔領域は感染による炎症性反応や、免疫反応が活発であるが、これらに伴ったエピジェネティックスについての報告はほとんどみられない。われわれは、最近、*P. gingivalis* 由来の LPS が骨芽細胞転写因子である RUNX2 の高メチル化とヒストン H3 の脱アセチル化を引き起こすこと (J. Microb. Immunol. infect. 2012 in press) や、歯根嚢胞における E-cadherin と COX-2 の高メチル化を明らかにした (本学会で発表)。本発表では、口腔領域の炎症性疾患の発症や進行へ関わるエピジェネティックスについて考察する予定である。

SS4-2

生命医科学におけるエピジェネティクスとエピゲノム  
 塩田 邦郎  
 東大 院農 応用動物科学・獣医、細胞生化

私たちの体は約 60 兆個もの細胞（数百種類）から出来上がっています。1 個の受精卵から分裂と分化を繰り返し、受精を担う生殖細胞も受精卵から分化した細胞から生じます。細胞を作る情報は約 30 億塩基対ものゲノム DNA に書き込まれています。細胞のすべての種類でゲノムの塩基配列には違いはないと考えられています。クローン動物が生まれたり、胚性幹細胞（ES 細胞）や iPS 細胞が調整され再生医療が目前にせまるなど、生命科学の話題が豊富です。これらのことも、細胞の種類に関係なく、DNA はどの細胞でも同じだと考えたほうが理屈が合います。では、“同じ情報の DNA がどのようにして異なった細胞の種類を生み出せるのか？”、古くて新しい疑問です。エピジェネティクス（Epigenetics）は「DNA の変異を伴わない、細胞世代を超えて継続する遺伝子機能を研究する学問分野」と定義され、この疑問に答えてくれる学問領域です。エピジェネティクスはジェネティクス（遺伝学、Genetics）に接頭語エピにつなげた言葉です。エピローグ（本などの後書き）の“エピ（Epi）”はギリシャ語で“接して”“後”を意味します。アリストテレスの時代に、人間の体がどのように出来上がるのか？という疑問に対して、主流派は、目に見えないほどの小さな人間が卵に入っており、大きくなるのだという「前成説、genesis」を唱えました。アリストテレスら少数派は、元々は人の形はしていないが、徐々に体が出来上がるという「後成説、Epigenesis」を唱えました。このときの「後」もエピの語源の 1 つと解釈されています。エピゲノムはエピジェネティクス情報の総体を意味します。エピジェネティクスの役者は、DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチン構造変化、ヒストン構成分子の変化、および非コード RNA などです。これらの因子により塩基配列を変えることなく、特定の遺伝子の不活性化がおこり、細胞に特異的な遺伝子発現セットが決定され数百種類の細胞が生じるのです。エピジェネティクス情報は、細胞が分裂しても継続しますから、慢性的な細胞の異常も継続することになります。エピジェネティクスは、発生や生殖、病気のマカニズム、新たな診断法、環境汚染物質の評価、食品や薬物の安全性、再生医療、感染症など、様々な生命科学の新たなパラダイムです。口腔疾患を含む疾患発症へのエピジェネティクス関与の可能性について新旧データを交え、私の考えを紹介致します。

SS4-3

歯胚発生とエピジェネティクス  
 福本 敏  
 東北大 院歯 小児歯

エピジェネティクスとは、“DNA 配列の変化を伴わない、遺伝子発現における遺伝的な変化”として定義づけられている。この遺伝子発現におけるエピジェネティックな変化は、大部分がクロマチン構造の変化や RNAi によるものとされており、その転写制御の重要な要因として DNA のメチル化、ヒストン修飾、非ヒストンクロマチン蛋白、siRNA、miRNA 等が挙げられる。

歯胚発生過程におけるエピジェネティックな解析として、クロマチンに関連した多能性因子として cp27 が同定された。マウスの歯胚の器官培養系において、cp27 の発現抑制を行うと歯胚形成が抑制され、cp27 の活性化により歯胚サイズが 2 倍になることが報告され、クロマチンの構造変化が組織のサイズ決定に関わることが見いだされた。また、278 例の一卵性双生児を対象とした解析から、24 症例（8.6%）において双生児間で異なる歯の先天欠如が見つかり、9 症例（3.2%）において過剰歯の発生数に違いが認められたとの報告がなされた。これらの結果は、Msx1、Msx2、PAX9 などの発現制御に関わるエピジェネティックな変化と予想される。このことから、遺伝子変異を伴わない発現制御が、歯の形成の初期過程あるいは歯の大きさ決定に関与していることが示唆された。

我々は、エピジェネティックな遺伝子発現制御の中で、miRNA による遺伝子発現制御に着目し、歯胚の発生過程における miRNA 発現解析を行った。胎生 16 日、出生後 1、3 日のマウス歯胚から miRNA を抽出し、ジェノパール DNA マイクロアレーを用いた解析した。その結果、mmu-miR-18、124a、127、301 は胎生 16 日、出生後 1 日の間にその発現が減少する傾向を示し、mmu-miR-1、15b、19a、20b、31、93、106b、125a、130b、133a、296 は出生後 1 日から 3 日目にかけて減少した。マウスモデルを用いた解析から、ギャップ結合分子 Cx43 がエナメル質形成に必須の分子であり、本分子の遺伝子変異が眼歯指異形成症を示すことを明らかにしてきた。Cx43 の発現制御に関わる miRNA は、mmu-miR-1、101a、101b、200a、338-3p、376a、434-3p が予想されていたが、歯胚発生過程においては mmu-miR-1 がその発現制御に関わっており、歯原性上皮細胞における細胞増殖制御にかかわっていることを明らかにした。これらの結果から、mmu-miR-1 の制御オリゴを用いることで、エナメル芽細胞の分化を制御できる可能性が示唆された。

SS4-4

Angelman 症候群と Prader-Willi 症候群のエピジェネティクス  
太田 亨  
北医大 個体差健康科学研

Angelman 症候群と Prader-Willi 症候群は、比較的まれな先天異常症候群であるが、この症候群の発症機序解明はエピジェネティクスに関わるさまざまな分子遺伝学的機構を解明するモデルになる。

相同染色体の 15q11-13 における同じ部位の欠失はこの両疾患の原因となるが、母親由来染色体上の欠失で Angelman 症候群に、父親由来染色体上の欠失で Prader-Willi 症候群になる。これは、15q11-13 領域上の遺伝子は親由来の違いにより発現パターンが変わるインプリンティング遺伝子が存在するからである。一般的に遺伝子の発現は、よく知られているように転写因子などの核外から trans に働くタンパクの働きにより目的の遺伝子が発現する。転写因子などは、DNA 上の特異的な塩基配列に配合することによりポリメラーゼなどを呼び込むのは、よく知られている機序である。核内の両親由来染色体は、2つが多型以外にまったく同じ塩基配列持っているが、このような転写因子などが認識できる、親由来の違いを決定するもう一つの情報がなくてはいけない。また、親由来を既定するマークは生殖細胞から必要であり、体細胞の細胞分裂による DNA 複製後もそのマークの維持が必要である。このように塩基配列によらない遺伝する因子が存在する。ゲノム上の CpG のシトシンメチル化の有無は、DNA の複製後もそのパターンを維持できる現在見つかった唯一の遺伝する塩基配列以外の因子である。一般的にさまざまな染色体上に存在するインプリンティング遺伝子は、相反する親由来発現遺伝子群が隣接してクラスターを形成し、インプリンティングドメインを形成している。このインプリンティングドメインのゲノム上に存在する調節中枢によって遺伝子発現が調節されている。15q11-13 領域の調節中枢は、母親由来染色体上ではメチル化、父親由来では非メチル化が、どの組織の細胞でも安定してみられる。このメチル化が親由来マークになっていると思われる。しかし、メチル化のマークが必ずしもプライマリーなマークではない事象も報告されている。ヒストンコードなど、複雑なエピジェネティクス機構が調節しているのであろう。臨床例を踏まえこれらのエピジェネティクス機序を考察する。

SS5-1

歯根と歯周組織の由来について  
馬場 麻人  
東医歯大 院医歯 硬組織構造生物

これまでに歯の形成過程について多くの研究が行われ、その情報蓄積には目を見張るものがあるが、未だ歯根形成とそれに伴う歯周組織形成についての解析は充分でないと考えられる。今回は歯根・歯周組織形成で報告されている興味深い所見に注目するとともに、その系統発生的な意義を検討し、歯根・歯周組織形成の由来を考える。

マウス・ラット・ヒトにおいて、象牙質は歯冠部をエナメル質に、歯根部をセメント質に覆われている。その象牙質自体も歯冠と歯根部の性質を異にすることが報告されており、一例を挙げれば歯冠のほうが硬く、石灰化に働く Ca・P あるいは燐タンパク質の含有量が多いことが知られている。さらには硬組織形成を抑制的に制御するような遺伝子改変を行ったマウスでは、歯冠部のほうが歯根部に比して受ける影響が少ないことも報告されており、dentin dysplasia I 型のヒト遺伝子疾患で歯冠形成がなされても歯根が形成されないという症状とも矛盾がない。また歯髓細胞の増殖能の検索では、歯冠形成初期と歯根形成期の 2 回の増殖ピークが報告されている。よってこれらの結果から歯冠と歯根象牙質は別の組織に由来するという可能性が示唆される。系統発生的に歯とその顎骨との接着装置という視点から観察すれば、魚類では哺乳類の歯冠だけに相当する歯が、歯の形成・脱落と同期して形成・吸収される骨組織（歯足骨）の上に載っている。両生類-爬虫類においては次第に歯根、歯根膜様構造を獲得していくが、しばしば象牙質は歯足骨上へも形成されていることが観察される。したがってこのような歯-歯足骨ユニットの歯の要素が歯足骨部を取り込むことを起源として、哺乳類の歯冠-歯根象牙質が出現すると考えられないだろうか？

歯周組織においては、象牙質特異的タンパクである dentin sialoprotein (DSP) がセメント質および、歯槽骨・歯根膜の初期形成部で局在しているが、この DSP 陽性の歯槽骨・歯根膜はやがて DSP 陰性の組織に置き換わる。言い換えれば歯周組織は、初期に歯胚を起源とするが、その後は周囲顎骨の非歯胚由来の形成（吸収）細胞によって維持されていくと考えることもできる。以上より歯冠-歯根-歯周組織-顎骨というユニットは、歯根-歯周組織の部分で歯冠（系統発生的な歯の要素）と顎骨の両方の因子の影響を受けながら作られてきたという仮説を提案したい。

SS5-2

歯の再植・移植後の歯髄治癒過程における歯髄-歯周組織相互作用

武藤 徳子<sup>1)</sup>、石井 信之<sup>1)</sup>、大島 勇人<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>神歯大 歯内療法、<sup>2)</sup>新大 院医歯硬組織形態

私たちのからだは、外傷や切断などの物理的損傷に対しての治癒能力を備えており、その傷を受けた場所に依りて修復するが、象牙質・歯髄複合体においても修復現象が知られており、歯の損傷に対して、歯髄は優れた修復能力をもつ組織であると言える。咬耗、摩耗、う蝕、歯の切削や修復処置等の刺激に反応して局所的に象牙質が形成されるが、歯の再植・移植後の歯髄治癒過程では、歯髄内に象牙質が形成される場合に加え歯髄が骨組織に置換する場合がある。歯の抜去時には根尖孔で神経と血管が切断され一過性に血行が遮断され、多くの細胞がアポトーシスにより排除されるが、再植・移植後には歯周組織の神経と血管が根尖孔を通して歯髄内に侵入し、血行が回復するに従い歯髄が治癒に向かう。したがって、歯の再植・移植後の歯髄治癒過程は歯髄-歯周組織相互作用により進行すると考えられる。

我々が確立した歯の切削や再植・移植などの動物実験モデルにより、歯髄が高い防御・修復機能を有すると共に、骨組織形成能を含めた多分化能をもつ。歯の損傷後の歯髄治癒過程を考える場合、局所に存在する歯髄細胞の由来や硬組織形成能が重要になる。最近の歯髄生物学の分野では、歯髄には少なくとも二つの異なる由来をもつ細胞が存在すると考えられている。それは、従来から広く受け入れられている神経堤由来細胞に加え、血管と共に歯乳頭に進入する中胚葉由来細胞の存在である。一方で多分化能をもつ歯髄幹細胞の存在や血管要素である周皮細胞の象牙芽細胞への分化能も示唆されている。この考えに従えば、歯髄は象牙芽細胞に分化する能力のある神経堤由来細胞（および周皮細胞などの中胚葉由来細胞）と骨形成能をもつ中胚葉由来細胞（または別の神経堤由来細胞集団）のハイブリッドな組織、もしくは象牙芽細胞と骨芽細胞の両者への多分化能をもつ神経堤由来細胞が存在すると言える。

本講演では、歯髄幹細胞/前駆細胞の局在とその分化能についての最近の知見に加え、歯の損傷後の歯髄治癒過程に出現する破骨細胞系細胞と骨組織形成との連関、歯の発生過程や歯の移植後の歯髄治癒過程における歯髄固有細胞と非固有細胞の相互作用にも触れ、歯の発生や歯の損傷後の歯髄と歯周組織間のダイナミックな相互作用について議論したい。

SS5-3

肝細胞増殖因子による歯根形成の誘導  
藤原 尚樹、坂野 深香、大津 圭史、  
原田 英光

岩医大 解剖 発生生物・再生医学

歯根形成は歯冠形成が終了した後、エナメル器の歯頸部端に Hertwig 上皮鞘 (HERS) が形成されることで開始する。HERS は将来の根尖方向へ伸長し、上皮-間葉相互作用によって歯根形成を誘導する。しかし歯根形成過程の調節メカニズムや因子は未だ不明な点が残されている。これまで我々は線維芽細胞成長因子 (Fgf)-3 と-10 の発現の消失、また上皮成長因子 (Egf) の down-regulation、インスリン様成長因子 (Igf)-I の up-regulation が歯冠の形態形成から歯根形成への移行に重要であることを報告してきた。これらの一連の研究の中で、我々は齧歯類の胎生期歯胚において上皮間葉相互作用の調節因子として知られている肝細胞増殖因子 (Hgf) の歯根形成における役割を検討するため、その receptor である c-met の発現を免疫組織化学的に調べた。c-met は外エナメル上皮 (OEE) とそれに引き続く HERS に強い陽性反応が見られた。我々は次に HERS 由来細胞株、HERS01a と生後マウス下顎第一臼歯器官培養を用いて Hgf の作用を検討した。Hgf は HERS01a の細胞増殖を濃度依存的に、また器官培養下の HERS の伸長を促進した。器官培養歯胚での BrdU assay の結果は HERS の OEE で BrdU 陽性細胞を増加させた。すなわち Hgf は OEE の細胞増殖を促進し、それによって HERS 形成を促進したと考えられた。さらに、歯根形成開始前の臼歯の歯髄に Hgf をしみ込ませたビーズを埋め込み (Hgf 群)、この歯胚を SCID マウス腎被膜下に移植する実験を行った。その結果、Hgf 群は歯根の成長を促進し、移植した3週間の間に対照群に比べて長さが2倍になった。さらに、Hgf は歯根形成に対する促進作用だけでなく、セメント質・歯槽骨・歯根膜などの歯周組織の形成も対照群に比較して促進した。これらの結果から本研究は Hgf signaling が HERS 発達を通して歯根形成をコントロールする可能性を示唆しており、歯周組織の再生医療への応用も期待できると考えている。

SS5-4

Shh-FGF 経路を介した歯根・歯周組織ユニットの発生機構

太田 正人

東医歯大 院医歯 分子発生

SS6-1

マウスジェネティクスが解き明かす口腔顎顔面領域の発生・病態形成メカニズム

秋山 治彦

京大 院医 感覚運動系外科

歯根は『釘植』に関連した哺乳類に特有の構造のひとつであり、哺乳類の多様化や進化にとって重要な構造であると考えられている。歯根の発生において、ヘルトビッチの上皮鞘 (HERS) がシグナリングセンターとして機能し、ソニックヘッジホッグ (SHH) 経路を中心として歯根の伸長やパターンニングを制御している可能性が示唆されている。これまでの研究において HERS は歯根形成に重要であることは示唆されているが、歯根発生の制御シグナリングの分子機構については不明な点が多い。

Shh-Fgf 制御機構が胎生期における歯胚発生において上皮-間葉相互作用の中心的な役割を果たすことから、この調節機構は生後の HERS の機能にも深く関与しているのではないかとの説を立て、歯根発生のシグナリングの分子機構にアプローチした。まず、Shh シグナル機構が *in vivo* の生理的条件下で機能しうるかどうかが検討するため、Shh レセプターの PTC1 タンパク質の細胞内ドメインに変異をもつ自然発症型ミュータントマウス *mesenchymal dysplasia* (MES) の表現型を解析した。ミュータントマウスにおいては、歯根の成長が完了するとすべての臼歯の歯根が野生型 (WT) よりも歯根長は生後 21 日齢で短かったが、生後 56 日ではほとんど差が認められなくなった。次に、SHH タンパク質の細胞増殖促進活性を検討したところ、HERS 由来細胞株 (HERS01a) では促進したが、歯根膜由来初代培養細胞 (PDL) では促進しなかった。また、PDL 細胞においては SHH 合成タンパク質が *Runx2* 遺伝子の発現誘導と ALP 活性の増加をもたらした。次に、いくつかの Fgf ファミリーの遺伝子発現レベルを MES マウスと WT マウスの発生過程の歯根で比較したところ、MES マウスの歯根で *Fgf18* だけの発現レベルが有意に低かった。歯根組織には、HERS、歯髄、PDL などの細胞が混在しているので、それらの細胞株でも FGF18 の発現量を検討したところ、PDL 細胞で *Fgf18* の発現レベルが高かった。また、ヒト FGF18 合成タンパク質は HERS01a 細胞の細胞増殖を促進し、幼若歯胚の歯根伸長を有意に促進した。以上のことから、HERS は SHH を産生して HERS 自身の細胞増殖を促進するだけでなく、PDL 細胞の骨芽細胞分化を促進し、歯根-歯根膜-歯槽骨複合体を *in vivo* で形成させるという歯根発生の制御シグナリングの分子機構が強く示唆された。

様々な遺伝子の機能解析は、従来 *in vitro* の無細胞系・細胞系を用いた研究が行われ、様々な知見を得、大きな進歩の道を行ってきた。しかし、組織発生などは *in vitro* では再現することができないため、生体内での遺伝子の機能を知るためには遺伝子改変技術を用いた遺伝子改変生物を作製し解析することが必要となる。1980 年に Martin Cline らによりトランスジェニックマウスが、1989 年には Mario Cappecchi らによりノックアウトマウスが作製されてから、われわれヒトと同じ哺乳類であるマウスを用いた研究は爆発的に広がりを見せ、ヒトの発生学など様々な学問分野で遺伝子機能が明らかにされて行った。骨格系発生もその例外ではなく、1990 年代に骨格パターン形成の解析から骨格形成関連遺伝子の解明まで多くの遺伝子改変マウスが作製され、この分野は大きく進歩した。さらに 1992 年に発表された Cre-loxP システムを用いたコンディショナル遺伝子改変技術は、時間的・空間的に生体内で遺伝子を操作することが出来、遺伝子機能解析の強力なツールとなった。また、1990 年後半から 2000 年代初頭にかけての骨分化マスター遺伝子 *Runx2* および *Ostrix*、軟骨分化マスター遺伝子 *Sox9* および *Sox5*, *Sox6* の発見は、骨軟骨発生学のブレークスルーであった。私は、内軟骨骨形成の分子メカニズムを解明するため、*Sox9* 遺伝子进行操作し、ノックアウトマウス・コンディショナルノックアウトマウス・ノックインマウス・トランスジェニックマウスを作製した。これら一連のマウスジェネティクス技術を用いた解析によって、骨格形成の分子機序が次第に明らかになって来ている。本サテライトシンポジウムでは、*Sox9* を中心とした転写複合体の解明と口腔学顔面領域を含めた骨格の発生・病態形成メカニズムに関して、最新の知見を紹介する。



SS6-2

異骨症モデルマウスを用いた骨格発生  
と病態の時空間的解析

飯村 忠浩

東医歯大 GCOE 口腔病理

SS6-3

Wnt5a-Ror2 シグナルによる破骨細胞  
分化制御機構

小林 泰浩

松歯大 総歯研 硬組織疾患制御再建

脊椎肋骨異骨症は先天性に中軸骨格に変形を起こす疾患である。近年、一部の原因遺伝子が4種類特定され、いずれも軸骨格の原基となる体節形成に重要な分子機構である「分節時計」に関与する遺伝子であった。その原因遺伝子の一つである MESP2 は、類縁疾患である脊椎胸郭異骨症でも配列の変異が発見されている。分節時計は Notch シグナルの周期的な活性化と脱活性化による分子振動機構で、これによって、体節は一定の時間的空間的リズムで形成される。転写因子をコードする MESP2 は、分節時計の標的の一つであり、体節と体節の境界（1次分節化）を規定する役割を担っている。また同時に個々の体節の極性化（2次分節化）にも必須である。これまでに、MESP2 の体節形成に関する研究は多く行われてきたが、その異常が脊椎の骨・軟骨組織にどのように影響するかは明らかにされていない。本研究では、脊椎肋骨異骨症および脊椎胸郭異骨症の発生病因を探るため、Mesp2-null マウスの脊椎発生を解析した。

胎生 16.5 日胚の組織切片を作成し、組織染色・蛍光免疫染色・in situ hybridization で観察を行った。次に胎生 18.5 日胚を Von Kossa 染色、3次元 CT、pQCT の手法を用いて観察を行った。

その結果、Mesp2-null マウスでは椎体同士の融合傾向が強く、また椎間板の挿入は減少しており、3次元 CT 像は脊椎肋骨異骨症および脊椎胸郭異骨症の特徴的なレントゲン所見と酷似していた。また、椎体における内軟骨性骨化は遅延していた。pQCT においても内軟骨性骨化の遅延を示唆する結果となった。

これらの解析から、椎体・椎間板が規則正しく形成・配列されるためには分節時計が正常に機能することが必須であることが明らかとなった。脊椎肋骨異骨症および脊椎胸郭異骨症に特徴的なレントゲン所見の発症には、広範な椎体の癒合と軟骨性骨化に遅延が関与することが明らかとなった。しかしながら、体節形成とその極性化のメカニズムが、いかに椎体と椎間の運命決定、空間配置さらには骨格組織分化へ影響を与えるのか、多くのブラックボックスがあることが明らかとなった。

破骨細胞の分化は骨芽細胞や骨細胞などの骨芽細胞系細胞（以下骨芽細胞と略す）によって調節されている。骨芽細胞は、活性型ビタミン D<sub>3</sub>などの骨吸収因子の刺激により receptor activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) を発現する。また、骨芽細胞は colony stimulating factor1 (CSF1) を恒常的に発現する。これらのサイトカインが前駆細胞の RANKL 受容体である RANK、CSF1 受容体に結合すると、破骨細胞分化が誘導される。骨芽細胞は、RANKL のデコイ受容体である Osteoprotegerin を分泌し、RANKL と RANK の結合を阻害することで、破骨細胞分化を抑制する。RANKL 欠損マウスは破骨細胞分化が障害されるため、大理石骨病を呈する。我々は、破骨細胞が全く存在しない RANKL 欠損マウスにおいて骨芽細胞近傍に RANK 強陽性の破骨前駆細胞が局在することを免疫組織化学的解析により明らかにしている (*J Cell Biol.* 184 (4):541-554, 2009)。この所見は骨芽細胞が破骨前駆細胞の局在を決定する何らかの因子を発現する可能性を示唆する。Wnt のシグナル伝達には、 $\beta$ -カテニンを介する古典経路と  $\beta$ -カテニンを介さない非古典経路がある。骨芽細胞において Wnt 古典経路が活性化されると、破骨細胞分化阻害因子である Osteoprotegerin の発現が誘導され、破骨細胞分化が抑制される。しかし、骨吸収における Wnt 非古典経路の役割は明らかではない。Wnt5a は、典型的な Wnt 非古典経路を活性化するリガンドで、共受容体 Ror2 に結合しシグナルを活性化する。我々は、骨芽細胞が非古典経路を活性化する Wnt5a を強発現すること、Wnt5a が、破骨細胞前駆細胞に発現する Ror2 受容体を介して、RANKL による破骨細胞形成を著しく亢進することを見出している。本シンポジウムでは、マウスジェネティクスを用いた解析を用いてどのように破骨細胞分化における Wnt5a-Ror2 シグナルの役割を解析してきたか、さらに関節炎モデルにおける Wnt5a シグナルの役割に関する知見をお話したい。

SS6-4

低分子量 G タンパク質 Rac1 および Cdc42 の骨・軟骨形成における機能解析

山田 篤  
昭大 歯 口腔生化

真核生物における細胞骨格の制御は、細胞内構造の確立・維持、細胞表面の形態形成と再構築、さらには細胞自体の移動など、限られた空間の中で細胞が秩序をもって増殖・分化・細胞死の過程を経る中で重要であることは論を俟たない。これまで、細胞骨格を構成するアクチンフィラメントの制御を担う Rho ファミリー低分子量 G タンパク質、Rac1 および Cdc42 は、細胞内スイッチとしての活性化機構、エフェクター分子の制御機構、アクチン重合により形成されるラメリポディア・フィロポディアなどの細胞構造の制御機構など、*in vitro* で様々な機能解析が行われてきた。*in vivo* における Rac1 および Cdc42 の機能を検討する目的で作製された全身で遺伝子が欠損するコンベンショナルノックアウトマウスは、Rac1、Cdc42 とともに胎生初期で致死となるため、時・空間でその発現を制御するコンディショナルマウスの作製が必要となった。われわれは、主に肢芽間充織細胞で遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (*Rac1<sup>fl/fl</sup>; Prx1-Cre; Rac1 cKO*, *Cdc42<sup>fl/fl</sup>; Prx1-Cre; Cdc42 cKO*) を作製し、四肢・顎顔面形成を中心とした骨・軟骨形成における Rac1 および Cdc42 の機能解析を行ってきた。Rac1 cKO マウスの四肢は、成長板肥大軟骨細胞の早期分化による短縮、指間部軟組織の癒合(合指症)等の表現型が認められ、また顎顔面では、頭蓋骨の石灰化不全および頭頂骨包合部の癒合不全などの表現型が認められた。*in vitro* において機能重複が示唆されてきた Rac1 と Cdc42 は、*in vivo* においても重複した機能が認められ、Cdc42 cKO マウスは四肢の短縮および頭蓋骨の石灰化不全および頭頂骨包合部の癒合不全など、Rac1 cKO マウスと同様の表現型を示す一方、興味深いことに、指骨間の癒合や口蓋裂など、Rac1 cKO マウスでは認められず Cdc42 cKO マウスのみで認められた表現型も存在した。以上の結果から、Rac1 と Cdc42 は四肢・顎顔面形成に関して必須の遺伝子であること、また、共通の機能を有するとともに、組織間において異なる機能を有することが示唆された。本サテライトシンポジウムでは、Rac1 および Cdc42 コンディショナルノックアウトマウスの表現型の解析結果を中心に報告するとともに、四肢・顎顔面形成における Rac1 および Cdc42 の機能に関して、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質が介する細胞内シグナル伝達、細胞骨格の制御との関係など、先生方とディスカッションできれば幸いと考えている。

SS6-5

エピプロフィン欠損マウスモデルの解析

中村 卓史  
東北大 院歯 小児発達歯

我々が同定したエピプロフィンは、発生歯胚初期の歯原性上皮細胞に発現しているが、歯の発生が進行すると、内エナメル芽細胞、エナメル芽細胞に局限した発現パターンを示し、エピプロフィン欠損 (Epf<sup>n</sup> KO) マウスは、過剰歯形成、歯原性上皮細胞の増殖と分化異常など歯の発生に重篤な障害を呈する。さらなる解析により、Epf<sup>n</sup> KO マウスは歯胚だけでなく、上皮、毛根、副甲状腺などの組織にも異常を認めることが明らかとなった。

Epf<sup>n</sup> KO マウスの歯胚、上皮、毛根、副甲状腺は、コントロールマウスと比較し、構成細胞数が増大、組織の肥厚・肥大化が認められた。一方で、Epf<sup>n</sup> KO マウスでの各組織における細胞の増殖活性が低下していることから、エピプロフィンが、これらの組織細胞の増殖調節に複雑に関わっていることが強く示唆された。

今回我々は、エピプロフィンが細胞増殖にどのように関与し、機能を発揮しているかを明らかにするため、Epf<sup>n</sup> KO マウスの皮膚上皮細胞を用いて解析を行った。その結果、Epf<sup>n</sup> KO マウスの皮膚上皮細胞は、細胞増殖活性が低下し、G1 期の細胞周期にある細胞群が増加していた。そこで、G1 期から S 期への移行期に特異的に発現する Rb のリン酸化蛋白の発現を検討したところ、Epf<sup>n</sup> KO マウスの皮膚上皮細胞では、Rb のリン酸化が阻害されていた。これらのことから、エピプロフィンが Rb のリン酸化を制御し、細胞周期調節因子として G1/S チェックポイントを制御していることが示唆された。これらの知見は、歯胚、毛根、副甲状腺組織でも同様に認められるため、組織特異的に発現しているエピプロフィンの普遍的な分子機能の一つであると考えられる。一方でエピプロフィンは、歯胚ではエナメル基質蛋白、毛根では毛のシャフト蛋白、そして副甲状腺では副甲状腺ホルモンの発現調節など、転写因子として組織特異的な機能を発揮している。最近、Epf<sup>n</sup> KO マウスの骨量の減少が、副甲状腺ホルモンの増加に起因していることが明らかとなった。本サテライトシンポジウムでは、組織特異的に発現しているエピプロフィンの多様な生物活性とその作用機構について考察する。

SS7-1

The oral microbiome in disease and health

William Wade

Microbiol. Unit, King's Coll. London Dent. Inst.

The human oral cavity harbours a complex commensal microbiota including fungi, protozoa, viruses, *Archaea* and *Bacteria*. The *Bacteria* are numerically dominant and around 1200 bacterial species belonging to 15 phyla are listed in the Human Oral Microbiome database ([www.homd.org](http://www.homd.org)). The oral microbiome is generally stable in adults and little geographical variation has been found. Culture-independent methods targeting 16S rRNA have revealed numerous novel lineages of oral bacteria, many of which are predicted to be obligate anaerobes. Around half of oral bacteria cannot be cultured and this has been a major obstacle to understanding their role in health and disease. It has been hypothesised that one reason for unculturability is that members of certain taxa are adapted to growing in mixed-species biofilms and have thus become dependent on the presence of other taxa for growth. Members of the previously uncultivated *Synergistetes* Cluster A have been successfully grown in co-culture *in vitro* and following extended incubation and passaging, have been domesticated so that they can grow on agar media with a single co-culture partner. The recently described *Fretibacterium fastidiosum* strain SGP1 was grown in this way which has enabled its genome sequence to be obtained. A systematic approach to the culture of the remaining as yet uncultivated oral anaerobic lineages is required. The introduction of next generation high throughput sequencing methods such as pyrosequencing has facilitated the characterisation and comparison of the oral microbiota in health and disease. These methods have been used in studies to determine the changes in microbiota in experimental gingivitis and periodontitis and have identified new potential pathogens associated with these conditions.

SS7-2

Oral microflora in dry mouth patients determined by T-RFLP analysis

Yoshiko Hayashi<sup>1)</sup>, Toru Saito<sup>1)</sup>, Takuya Arita<sup>1)</sup>, Tomoko Ohshima<sup>2)</sup>, Yoichi Nakagawa<sup>3)</sup> and Nobuko Maeda<sup>2)</sup>  
R&D Dept., Sunstar Inc.<sup>1)</sup>, Dept. Oral Microbiol., Sch. Dent. Med., Tsurumi Univ.<sup>2)</sup>, Dept. Clinical Pathophysiol., Tsurumi Univ. Dent. Hospital<sup>3)</sup>

Previous studies have shown that a reduction of salivary secretion, that is hyposalivation, causes increase in some pathogens. However, those bacteriological studies have been conducted by conventional culture-dependent or targeted DNA approaches, which do not reflect unculturable oral microbial community. We investigated the oral microflora of one hundred dry mouth outpatients in Tsurumi University Dental Hospital by analyzing terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) of 16S rDNA, and explored the relationship between microflora and clinical status such as salivary volume, Plaque Index, Gingival Index, Bleeding on probing, Probing pocket depth and DMFT. According to the T-RFLP profiles from tongue coating samples, the subjects were classified into two clusters, "Cluster I" and "Cluster II". Both of the stimulated and the unstimulated salivary flow rates were significantly decreased in "Cluster I" as compared to "Cluster II" ( $p=0.009$ ,  $p=0.018$ , respectively). Moreover, a stepwise logistic regression analysis showed the unstimulated salivary flow rate was as an independent predictor, and the odds ratio of "Cluster I" was 3.505 times higher (95% CI: 1.514-8.114,  $p=0.003$ ) when the unstimulated salivary flow rate was  $\leq 0.1$  ml/min. In the T-RFLP profile of "Cluster I", genera *Veillonella*, *Prevotella*, and *Streptococcus* were more predominant than in "Cluster II", while genera *Neisseria*, *Haemophilus*, and *Porphyromonas* were more minor. The T-RFLP profiles of "Cluster I" was appeared to be an independent predictors contributing to the DMFT. In conclusion, a T-RFLP analysis showed the salivary volume played a significant role in determining the compositions of the oral microflora, with unculturable species. This study provides basic data on changes in the microbial community due to decreases in the salivary flow rate in the mouth.

SS7-3

An approach to the fungicidal mechanism of antimicrobial peptides, human beta-Defensins against *Candida albicans*

Hitoshi Watanabe, Tomoko Ohshima and Nobuko Maeda

Dept. Oral Microbiol., Sch. Dent. Med., Tsurumi Univ.

Several kinds of anti-microbial peptides are produced from human oral mucosa and salivary glands, and play an important role in innate immune systems. Particularly, human beta-Defensins (hBD2 and hBD3) and Histatin-5 have been noticed as fungicidal peptides against *Candida*. However, the precise fungicidal mechanism of those peptides was not known yet.

In this study, we examined the fungicidal mechanism of hBDs against *Candida* with several metabolic inhibitors. When compared the fungicidal effects of hBDs under aerobic and anaerobic conditions without the metabolic inhibitors, the effect was higher under aerobic condition than anaerobic. This result indicated that the target of hBDs located in the metabolic pathway of *Candida*. The effects of the metabolic inhibitors for each of glycolytic pathway, TCA cycle, or electron transporter complex I-IV on the fungicidal activities were determined. In aerobic condition, the effect of hBD2 was reduced when the glycolytic pathway or the complex IV was inhibited, however, the hBD3 was not affected at all. These results strongly suggested that hBD2 has the target in the metabolic pathway of *Candida* but hBD3 has other target.

SS7-4

Micromolar level NaF promotes epithelial cell growth and reduces *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss

Ujjal K. Bhawal<sup>1,2)</sup>

Dept. Biochem. Mol. Biol., Nihon Univ. Sch. Dent. Matsudo<sup>1)</sup>, Dept. Health Sci., Div. Oral Health, Kanagawa Dent. Coll.<sup>2)</sup>

Low fluoride doses promote osteoblast proliferation, stimulating bone formation *in vitro* and *in vivo*. The proliferative activity of fluoride in osteoblasts and also in epithelial cells is biphasic, being mitogenic at micromolar doses but inhibitory for mitosis at millimolar levels. Nevertheless, the molecular mechanisms of the biological effects of fluoride on epithelia are poorly investigated. In the present study, we sought to elucidate the pattern of the molecular mechanisms governing the epithelial cells to micromolar level of NaF treatment likely involve multiple converging signal transduction pathways. Moreover, we investigated the effect of systemic fluoride application on alveolar bone loss induced by *Porphyromonas gingivalis* infection.

Primary human gingival epithelial cells (HGECs) were cultured with micromolar NaF. Total RNA was extracted after 6 and 24 hrs of infection and monitored mRNA levels using Affymetrix GeneChip (Human Genome U133 plus 2.0 Array, 48,000 genes). GeneChip data was analyzed by GeneSpring software and Ingenuity Pathway Analysis (IPA) system. Real-time RT-PCR was used to investigate the gene expression changes. Protein expression was evaluated using an experimental rat model of skin wound healing. Micro CT analysis of alveolar bone was performed in *P. gingivalis*-challenged periodontitis in rats. Horizontal alveolar bone loss was evaluated by measuring the distance between the cemento-enamel junction and the alveolar bone crest. Specimens from periodontal tissue were evaluated by staining with hematoxylin-eosin and tartrate-resistant acid phosphatase and immunohistochemistry was performed in *P. gingivalis*-challenged periodontitis in rats.

The differentially expressed genes represented functions as diverse as a variety of biological processes, including embryonic development, cell

growth, morphogenesis, tissue repair, and invasion. We have identified potent epithelial cell-specific growth factors belong to FGF family, whose mitogenic activity is predominantly exhibited in keratinocytes. The amount of bone loss and the expression of Cathepsin K, MMP-2, MMP-9 was significantly reduced in *P. gingivalis* + NaF group than that of *P. gingivalis* group. *P. gingivalis* + NaF group showed intense FGF staining in rat periodontal tissues.

These findings indicate that the molecular mechanisms underlying the FGF response of epithelial cells to micromolar NaF treatment likely involve multiple converging signal transduction pathways and low level fluoride in oral environment prevents the progression of *P. gingivalis*-challenged periodontitis in rats.

SS7-5

The virulence factors of *Actinomyces naeslundii*

Takenori Sato, Kiyoko Watanabe, Hidefumi Kumada, Toshizo Toyama and Nobushiro Hamada

Div. Microbiol., Dept. Infect. Cont., Kanagawa Dent. Coll.

*Actinomyces naeslundii*, plays an important role in forming dental biofilms and causes gingival inflammation. Although peptidoglycan, the major cell wall component of Gram-positive bacteria, has been demonstrated to induce inflammatory cytokines, little is known about the association of peptidoglycan with alveolar bone resorption.

Osteoclast formation and function induced by peptidoglycan of *A. naeslundii* T14V were examined using the co-culture system of MCTC3/PA6 cells and BALB/c mouse bone marrow cells. Osteoclast formation was evaluated to count TRAP-positive multi-nuclei cells as osteoclasts. The function of osteoclasts was assessed by measuring the areas of pits absorbed. Inflammatory cytokine genes expressions, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ , were examined by RT-PCR analysis using murine peritoneal macrophages. Experimental periodontitis was performed in Sprague-Dawley rats orally infected with *A. naeslundii*. TRAP-positive multi-nuclei cells and the areas of pits induced by peptidoglycan were significantly greater than controls. Gene expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  induced by *A. naeslundii* PGN were stronger than controls. In experimental periodontitis, bone loss of *A. naeslundii*-infected rats was comparable to that of rats induced by *P. gingivalis*, which has been reported to be a periodontal pathogenic agent, being significantly greater than that of the sham group.

Our findings suggest that *Actinomyces naeslundii* peptidoglycan induces the production of inflammatory cytokines and activates osteoclasts in alveolar bone resorption. In addition, we propose that peptidoglycan may be an important pathogenesis factor of periodontitis.

SS7-6

The biofilm formation with novel oral *Veillonella* spp., *V. tobetsuensis*  
Izumi Mashima and Futoshi Nakazawa  
Dept. Oral Microbiol., Sch. Dent.,  
Health Sci. Univ. Hokkaido

The genus *Veillonella* consists of small, strictly anaerobic, gram-negative cocci that lack flagella, spores, and capsule. Members of genus *Veillonella* have been isolated from the oral cavity and intestinal tract of humans and other animals. Previously, five species; *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, and *V. rogosae*, have been recognized as oral *Veillonella*, although 11 species have been established in the genus *Veillonella*. The main habitats of oral *Veillonella* are the tongue, dental biofilm, and buccal mucosa, and it has been suggested that oral *Veillonella* contribute to make the dental biofilm as early colonizer.

The distribution and frequency of oral *Veillonella* in the tongue biofilm of healthy human adults have been examined in our previous study. Twelve unknown strains belonging to genus *Veillonella* were isolated in the process of the study, and they could not be classified in any of the previously described species. Recently, based on phylogenetic and phenotypic analysis of these strains, they were proposed as novel *Veillonella* species, *Veillonella tobetsuensis*.

*V. tobetsuensis* were isolated from five out of 27 subjects, and detection level of *V. tobetsuensis* was almost the same as *V. parvula*. These results suggest that *V. tobetsuensis* has been associated with abscesses in the apical root canal and in the dentinal tubule.

In our present study, the biofilm formations of six oral *Veillonella* with *Streptococcus* spp. have been determined. Consequently, the amount of biofilm formation with *Streptococcus* and the microbial ratio in the biofilm depends on the *Veillonella* species as the partner. It has been also suggested that the role of oral *Veillonella* in the dental biofilm at the early stage vary depending on species of oral *Veillonella*.

SS7-7

Purification and characterization of hemolysin from *Prevotella oris*  
Toshiya Sato  
Dept. Oral Microbiol., Sch. Dent.,  
Health Sci. Univ. Hokkaido

Generally, the bacteria require an iron for growth. However, in humans, the concentration of free iron is limited, which is much lower than that required by the bacteria. Although some bacteria produce siderophores to sequester iron from lactoferrin and transferrin, siderophore-producing bacteria have not yet been identified from the oral regions. Therefore, hemolysin, which lyses erythrocytes to release hemoglobin, may be vital and important virulence factor for oral bacteria.

*Prevotella oris* is a nonpigmented, gram-negative, rod-shaped anaerobic bacterium frequently isolated from not only lesions of oral infections such as periodontal disease and spreading odontogenic infection, but also systemic infections such as empyema and meningitis. *P. oris* produces immunoglobulin A protease, hyaluronidase, and  $\beta$ -lactamase, suggesting that these factors may contribute to the pathogenic potential of the organism.

The hemolysin of *P. oris* is produced in the culture supernatant on logarithmic growth phase, although cell membrane and intracellular fraction did not show hemolytic activity. The hemolysin, purified by DEAE/CM ion-exchange chromatography and gel filtration chromatography, was observed as a 16-kDa band on SDS-PAGE gel. This hemolysin include proteinaceous compound, and hemolytic activity shows heat-labile.

This hemolysin lyses human, horse, sheep, and rabbit erythrocytes. The activity is enhanced by L-cysteine, dithiothreitol and 2-mercaptoethanol, which is similar to streptolysin O, thiol-activated toxin, produced by *Streptococcus pyogenes*. The hemolysin of *P. oris* binds to erythrocyte membrane before hemolysis with temperature dependent. However, because cholesterol had insignificant inhibition on activity, the binding site on erythrocyte may be different from that of streptolysin O.

We are presently attempting to clear the mechanisms of hemolysis, which contribute to better understand pathogenic potential of *P. oris*.

SS8-1

頭部静脈系を構成する血管内皮細胞の由来とそれを解剖学的構造へ導くメカニズム

磯貝 純夫、斉藤絵里奈、木村 英二、  
人見 次郎  
岩医大 医 解剖

Streeter はヒト頭部静脈系を、Congdon は鰓弓動脈系の形成過程を記載し、Padget はヒト胚切片標本の再構築法を用いて、頭部の主要な動脈（1948）と静脈（1957）の形成過程を詳細に明らかにした。MB1/QH1 などの特異的に血管内皮を標識するマーカーの出現は、ニワトリのヘンゼン結節頭側の中胚葉性細胞が頭側に移動して、頭部の血管系を確立することを示唆した（Coffin & Poole 1988）。Noden は、ウズラ初期胚組織のニワトリ胚への移植実験から、頭部では沿軸中胚葉と側板中胚葉に前駆細胞の存在を認め、Couly らは Quek1 と MB1/QH1 をマーカーとして、顔面と脳の血管系を形成する前駆細胞が、ウズラとニワトリのキメラ胚で頭部中胚葉の吻側にあることをマッピングした。しかし、脊椎動物の頭部血管系を形成する内皮細胞の起源と、それを解剖学的構造へと導くメカニズムは良く分かっていない。

我々は、血管内皮あるいはその前駆細胞が緑色蛍光を発現する *h1:EGFP* トランスジェニックゼブラフィッシュと二光子励起顕微鏡を用い、頭部で血管内皮前駆細胞が出現・集合して管腔を形成し、機能する頭部血管系を形成する過程をタイムラプスライブイメージとして捉えた。今回は頭部静脈系について述べる。初期胚頭部の原始排出路として出現する Primordial hindbrain channel (Streeter) が頭部間充織細胞に由来し、管腔形成的な過程を経て、前・中脳からの前主静脈へ連絡する一条の静脈として後脳領域に出現することを明らかにした。さらに頭部静脈系を構成する個々の静脈の内皮細胞の由来と、静脈へ分化した内皮前駆細胞が静脈系の解剖学的基本構造を作り上げてゆくメカニズムを探る。この過程はいずれの個体においても同様のタイムスケジュールに沿って進行し、プログラムされた因子により制御されることを強く示唆した。これらの内皮前駆細胞は血流の開始以前に既に静脈内皮へと分化しているが、最終的な動静脈決定への可塑性を残しており、血流の出現はその決定と確立された頭部静脈系の維持に深く関わることを示唆した。

SS8-2

顎顔面領域における筋の微小血管系  
佐藤 巖、三輪容子  
日歯大 生命歯 解剖一

筋形成段階において、種々の血管マーカーが筋周囲や筋内膜に発現することが知られており、筋の損傷に際しても再生初期の段階からこれらのマーカーの関与が報告されている。一方、筋肉の機能に応じて筋中の血管網も変化するといわれている（Egginton *et al.*, 2001; Pette and Staron, 2000）。特に、骨格筋においては筋中のリンパ管は運動レベルに応じて変化すること（Gehlert S, 2010）、大腿四頭筋の外側広筋における毛細血管吻合部に血管マーカーとともにリンパ管マーカーが発現している（Kivelä R, 2007）ことから、筋中にも他の器官と同様にリンパ管が存在していることが近年報告されてきた。さらに、心筋のリンパ系について微細形態レベルで調べた報告によれば、心外膜下にも発達したリンパ管網がみられ、この一部は下層部で心筋のリンパ管と吻合する（Shimada T *et al.* 1989）。このため、筋中におけるリンパ管分布についてこれまでの研究を紹介する。さらに、これまでに吸啜から咀嚼への機能が大きく変化する咀嚼筋の成長期の筋線維タイプの構成や筋の生化学的、組織学的変化を当教室では研究を進めてきた経緯から、今回頭頸部の血管網の構築についての研究を加え、現在までに頭頸部の脈管系の血管マーカー（CD31）とリンパ管マーカー（LYVE-1）の mRNA レベルを調べ、その動態から筋の機能変化との関連性について報告してきた（Sato *et al.*, 2008）。しかし、頭頸部においては他の骨格筋とは機能的にも異なり、筋内部の腱の存在をはじめとして筋線維構成など形態的にも異なるとされるが、頭頸部の筋中のリンパ管の分布および発達についての報告はほとんどなされていない。咀嚼筋である咬筋は深部と浅部に分かれ、腱性も多いことから、筋束形成と腱形成との関係についても脈管系のマーカーと血管新生抑制マーカーである tenomodulin の発現から検討し、筋中の微小血管系について評価する。特にこれらの因子は生後5日前後を境に変化していることから、この時期のリンパ管マーカーの局在性の評価も加えた成長期の機能変化との関係性を示す。さらに、その他の頭頸部の筋についても同様の検索から、顎顔面領域における筋相互間の血管因子の発現から筋の機能を評価し、成長における筋の微小血管系の動態を検討した。

SS8-3

上皮下のリンパ管構築と薬剤投与としてのリンパ管

安藤 禎紀、藤村 朗  
岩医大 解剖 機能形態

頭頸部領域の脈管系、特にリンパ管に関する研究は非常に少なく、他の部位に比べるとデータが少ない。その理由は研究面では硬組織の存在であり、酵素組織化学、免疫組織化学的手法が利用できなかったためと思われる。しかしながら、臨床的にはほとんど興味をもたれなかったためと思われる。近年、センチネルコンセプトが外科領域で推奨され、口腔外科系での臨床応用が行われたが、思ったほどの効果をあげられず、現在に至っている。我々はこのセンチネルリンパ節の明示法からヒントを得て、腫瘍原発部に抗癌剤を直接注入し、原発周囲のリンパ管から転移したセンチネルリンパ節（解剖学では所属リンパ節）に薬剤を輸送させることを思い付いた。腫瘍局所と、転移した、または、転移している可能性がある所属リンパ節に、高濃度でしかも確実に到達する方法として考えている。過去に同様の考え方で研究を行ったようであるが、組織の壊死等問題が多く、断念した方法である。我々は投与濃度、投与量を極端に少なくすることで組織の壊死は解決した。しかも、原発巣、所属リンパ節に到達する抗癌剤の濃度を直接元素分析で計測し、充分量がそれぞれに分布していること、全身への投与量が通常の血管内注入の1/1000量であることから副作用の抑制にもつながるものと考えている。本研究は最近、薬学部創剤学講座との共同研究で本格的になり、徐放製剤化（リポソーム化）、さらにリポソームの徐放延長を設計した強化型、局所に注入後徐放開始までの時間延長を設計したコーティング型など、様々な剤型設計を行うことで、患者のQOLに還元できるものと考えている。さらに、薬剤を粘膜経由型にすることで患者の負担を軽減するため、口腔領域のリンパ管構築を検索し、吸収効率の高い部位で、しかも薬剤の設置が容易な部位（このような部位に設置するためのステントの開発を含む）を検索中である。この一環として、口腔粘膜のみならず、皮膚上皮下リンパ管網の部位による構築の違いから、皮下浮腫の治療につながるLLA術やLVA術の改善につながるものと期待している。

SS8-4

腫瘍における微小循環系の多様性

北原 秀治  
東女医大 医 解剖・発生生物

腫瘍は、その増殖のために、酸素や栄養分の供給が不可欠であり、様々な血管増殖因子群による複雑な分子経路を利用して血管新生を行っている。新生された腫瘍血管は、正常組織の血管とは形態や機能が大きく異なっており、それらのメカニズムの解明が、頭頸部領域のみならず、臨床治療において非常に重要である。近年、このような腫瘍血管をターゲットにした分子標的治療薬の開発や、腫瘍血管を正常血管に近づける腫瘍血管正常化（Normalization）といった治療法も注目を浴びているが、その治療法も未だ確立されておらず、副作用の問題もあり、さらなる腫瘍血管の解析と新たな癌治療法の開発が望まれる。では、腫瘍血管は正常血管とどのように違うのか？ また、腫瘍環境内でどのような成長をするのか？ これらの疑問を解決するために、まず高転移性株であるB16 melanomaと基底膜成分をベースとした培地（Matrigel）とをマウスに混合移植したB16/Matrigel腫瘍モデルを樹立し、腫瘍増殖に伴う微小循環系の変化と形態学的特徴を解析した。すると、腫瘍はその周囲の微小環境の変化に応じて、血管新生パターンを様々に変化させていることが示唆された。次に、局所における微小循環系の変化の過程を、今度は正常上皮から前癌状態ともいべき腺腫へ、そして徐々に腺癌へ移行していく消化器系腫瘍の特徴（多段階発癌）に着目して追跡すると、腸上皮の悪性化に伴い、微小循環系にも段階的な悪性化パターンが現れることがわかった。以上から、腫瘍の環境変化と腫瘍血管の変化は密接な関係があることが明らかとなった。そこで腫瘍血管の変化を抑えることができれば、腫瘍の悪性化を抑える事ができるのではないかと。つまり、腫瘍内に正常血管を再構築させると、腫瘍の環境変化が起こり、腫瘍の成長が抑制されるのではないかと。という仮説を立て、さらに研究を行った。腫瘍内に、正常内皮細胞、成長因子、足場といった組織再生に不可欠な三要素を投与すると、腫瘍壊死部位には正常血管と思われる構造が確認でき、血流の再開も確認でき、宿主側の血管と吻合していると考えられた。また、その低酸素化の改善により、腫瘍の増大も抑制されていた。このように、腫瘍血管の悪性化を制御することができれば、手術が困難な頭頸部領域においても、手術、化学、放射線療法以外の新しい治療法の実現につながることを期待される。