

**O-48**

副甲状腺ホルモン投与による骨細胞周囲の骨基質  
 変化について

○本郷 裕美<sup>1</sup>、山田 珠希<sup>1</sup>、宇田川 信之<sup>2</sup>、網  
 塚 憲生<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北大 院歯 硬組織発生生物、<sup>2</sup>松歯  
 大 生化)

【緒言】1960年代にBélangerにより、PTH投与による骨細胞  
 性骨溶解が提唱されたが、その機序は依然明らかになってい  
 ない。そこで我々は、マウスの外頸静脈にPTH投与し、数時間  
 後の骨細胞・骨小腔の変化について組織化学的に検索した。

【材料と方法】生後11週齢の雄性ICRマウスにhuman PTH(1-  
 34; 80 ug/kg)を外頸静脈投与し、数時間後における骨細胞・骨  
 小腔を原子間力顕微鏡によるナノインデンテーション、透過型  
 電子顕微鏡およびvon Kossa染色にて観察した。また破骨細胞  
 が存在しないRANKL-/-マウスにカルセインを投与し蛍光  
 顕微鏡観察した。

【結果と考察】PTH投与後6時間の皮質骨において、一部の骨  
 小腔が僅かな形状変化を示したが、骨小腔周囲は著しい弾性率  
 の低下を示した。9時間後には、骨小腔は拡大し、その周囲に  
 はvon Kossa陰性の末石灰化骨基質が認められた。そのよう  
 な骨小腔壁は凹凸を示し、内部には断片的な石灰化基質とコ  
 ラゲン線維が観察された。一方で、RANKL-/-マウスの骨小  
 腔周囲にはカルセイン標識を観察したことから、小腔壁への石  
 灰化が示唆された。以上より、骨細胞はPTHなどに反応して、  
 骨小腔周囲の骨基質を融解、あるいは、石灰化沈着を行う可  
 能性が推察された。(本研究は阪大学・中野貴由教授との共同研  
 究として行われた)。

**O-49**

副甲状腺ホルモン間歇投与の頻度が骨の細胞動態  
 に及ぼす影響について

○山本 知真也<sup>1</sup>、佐々木 宗輝<sup>1</sup>、本郷 裕美<sup>1</sup>、  
 長谷川 智香<sup>1</sup>、山田 珠希<sup>1</sup>、山本 恒之<sup>1</sup>、網塚  
 憲生<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北大 院歯 硬組織発生生物)

【背景・目的】副甲状腺ホルモン(PTH)の間歇投与によって骨  
 形成優位となるが、間歇投与の頻度の違いがどのように骨形成  
 に影響するか明らかになっていない。そこで、我々はマウスに  
 合成型hPTH(1-34)を異なる頻度で投与した場合の骨の細胞群  
 の変化について組織化学的に解析した。【材料と方法】生後6  
 週齢雄性マウスにPTH(80 μg/kg)を4回/日、2回/日(以上、  
 高頻度群)、1回/2日、1回/2日(以上、低頻度群)で2週間、  
 腹腔内投与した。アルデヒド固定後、通法にてパラフィン包埋  
 を行い、ALP, TRAP, OCN, OPN組織化学を行った。また、一  
 部のサンプルをEpon樹脂包埋して透過型電子顕微鏡観察を  
 行った。【結果と考察】PTH高頻度群では多数の不規則な骨梁  
 が形成されており、鋸歯状の骨表面やOPN/OCN陽性セメン  
 トラインを観察した。骨梁周囲にはALP強陽性前骨芽細胞の  
 厚い細胞層と多数のTRAP陽性破骨細胞が局在したことから、  
 活発なりモデリングが推測された。一方、PTH低頻度群では  
 前骨芽細胞による細胞層はあまり発達せず、滑らかな骨表面と  
 セメントラインが認められ、比較的太い骨梁が形成されていた。  
 以上から、PTH高頻度投与ではモデリングにより、また、低  
 頻度投与ではミニモデリングにより骨形成が誘導される可能性  
 が高いと考え、現在、検索を進めている。

**O-50**

FGF18とFGF2はマウス頭蓋冠骨形成過程に相  
 反する効果を示す

○井関 祥子<sup>1</sup>、奥原 滋<sup>1</sup>、太田 正人<sup>1</sup>、春日井  
 昇平<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東医歯大 院医歯 分子発生、<sup>2</sup>東医歯大  
 院医歯 インプラント口腔再生医学)

線維芽細胞増殖因子(FGF)の受容体、FGFRにおける活性型  
 変異は、頭蓋骨縫合早期癒合症などの骨格系の先天異常を引き  
 起こす。これらの変異はリガンドに対する親和性の増強、リガ  
 ンド-受容体の特異性の喪失を引き起こす。FGFリガンドの  
 中でFGF2とFGF18は、遺伝子欠失マウスが骨形成に異常を  
 示す。そこで本研究ではFGF2とFGF18をマウス頭蓋冠骨に  
 in vivoで作用させ、その影響について検討した。FGF18は適  
 用領域の骨石灰化を促進し、FGF2は抑制した。FGF18は骨芽  
 細胞分化マーカー、骨芽細胞における*Fgfr2*と*Fgfr3*、および  
*Bmp2*の発現レベルを上昇させたが、この効果はNogginとの  
 併用の適用によって中和された。一方、FGF2は、骨芽細胞分  
 化マーカー、骨芽細胞における*Fgfr2*および*Fgfr3*の発現を抑制  
 し、*Runx2*と*Fgfr1*の発現領域を*Twist1*の発現を伴ってび  
 まんに拡大した。*Twist1*ヘテロ欠失マウス胎児にFGF2を  
 作用させると野生型胎児に対するFGF2の骨石灰化の抑制の  
 効果が減少した。以上の結果より、FGF18は、*Fgfr2*および  
*Fgfr3*、および*Bmp2*の発現レベルを上昇させることにより骨  
 芽細胞の分化を促進すること、FGF2は*Fgfr2*および*Fgfr3*の  
 発現レベルの減少と共に*Twist1*の発現を誘導して骨芽細胞分  
 化を抑制することが示唆された。

**O-51**

遠赤外線エネルギーを放射する流紋岩セラミック  
 スは骨形成を促進する

○Aldartsogt Dolgorsuren<sup>1</sup>、山下 菊治<sup>1</sup>、角田  
 佳折<sup>1</sup>、関 伸一郎<sup>1</sup>、益井 孝文<sup>1</sup>、北村 清一郎<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>徳大 院 HBS 口腔顎顔面形態)

[Objective] We aimed to make clear whether the Rhyolite  
 ceramics radiating FIR energy affected or not on the new bone  
 formation in vivo and in vitro. [Materials and methods]  
 MC3T3-E1 cells were cultured in FIR CO2 incubator radiating  
 FIR energy by Rhyolite or normal incubator. The proliferation  
 and the gene expression were analyzed by using the cell  
 counts, RT-PCR and micro array analysis. The enzyme activity  
 was analyzed by using Apizym kit. Still more, Rhyolite  
 compounds were implanted in artificial bone fracture of femur  
 by injection method and FIR energy was radiated by Rhyolite  
 from outside of implant. The samples were observed by the  
 light microscope. [Results and discussion] By FIR energy  
 radiating Rhyolite, the MC3T3-E1 cell proliferation was  
 inhibited, and bone nodules formation, gene expression of  
 alkaline phosphatase and osteocalcin were activated. On the  
 enzyme ALP, AP, Naphol-AS-BI-phosphohydase activity  
 was increased. Still more, by irradiating FIR energy, extensive  
 bone formation was actively induced. [Conclusion] The FIR  
 energy radiation by the Rhyolite ceramics promoted the bone-  
 forming activity.

**O-52**

Klf4 は軟骨細胞でのプロテアーゼの発現を制御する

○藤川 順司<sup>1,2</sup>、阿部 真土<sup>1</sup>、三浦 治朗<sup>3</sup>、脇坂 聡<sup>1</sup> (阪大 院歯 口腔解剖一、<sup>2</sup>阪大 歯病 障害者歯科、<sup>3</sup>阪大 歯病 総診)

Klf4 は体細胞を iPS 細胞に誘導する 4 因子の一つとして注目されているが、骨芽細胞に発現し骨格の正常発生に関わることを我々は以前報告した。骨芽細胞における Klf4 の発現は分化の進行に伴い減弱することが知られていたが、恒常的に Klf4 を過剰発現させることにより細胞外基質の発現が低下し、その分化は強く抑制された。

今回我々は Klf4 が軟骨細胞において軟骨基質の分解に関与する MMP や ADAMTS ファミリー因子の発現を促進することを見出した。Klf4 は検索したいずれの時期(生後 0 か月、2 か月、6 か月)においても関節軟骨表層の細胞 (superficial zone cells) にタンパクの局在が認められた。ただし、生後 6 か月齢においてはそれ以前の時期よりも発現は弱かった。マウス関節軟骨より採取した軟骨細胞に Klf4 を過剰発現させると、2 型コラーゲンやアグリカンの発現低下が認められると同時に MMP3、10、13、ADAMTS5 など多くの MMP、aggrecanase の発現上昇が見出された。我々は Klf4 が病的な軟骨破壊に関与する可能性を検討するため、リウマチ性関節炎を発症するモデルマウス (DICC マウス) の軟骨破壊部位での Klf4 の発現を検索した。その結果、軟骨破壊が起こっていない部位では Klf4 の局在は見られず、軟骨破壊が起こっている部位で軟骨細胞に Klf4 が局在していることが認められた。

これらの知見は Klf4 が少なくとも軟骨破壊を示す病的な状態において病状を進行させる作用があることを示唆している。

**O-54**

類骨における石灰化部位と骨細胞の超微構造学的解析

○三浦 治郎<sup>1</sup>、大家 香織<sup>1,2</sup>、佐藤 淳<sup>2</sup>、豊澤 悟<sup>2</sup> (阪大 歯病 総診、<sup>2</sup>阪大 院歯 口腔病理)

【目的】骨細胞 (OC) が特異的に産生する DMP1-KO マウスでは類骨が増加して骨細胞周囲に石灰化不全がみられ、くる病様の病態を示す事から、骨細胞の石灰化への関与が考えられる。本研究では、類骨における石灰化部位と DMP1 を発現する osteoid-, young-OC の位置関係を超微構造学的に検討した。【材料・方法】生後 4 週齢ラット (Wistar, ♂) の大腿骨を未脱灰でエポキシ包埋し、超薄およびトモグラフィ用切片を作製した。前記切片を透過型電子顕微鏡および超高压電子線トモグラフィにて、包埋樹脂は反射電子観察し、石灰化部位の評価を行った。これらの超微構造解析結果を DMP1 分布と比較検討した。【結果・考察】類骨の透過電顕、電子線トモグラフィ解析や反射電子観察から、類骨内に分布する osteoid-OC を中心に石灰化が起こっている像は観察されず、石灰化前線は類骨幅を維持して骨芽細胞層に平行に認められた。osteoid-OC が石灰化前線に近接すると、細胞周囲にはプロテオグリカンに類似した細顆粒状物を有したスペースが出現し、石灰化骨内に分布する OC の骨小腔に相当すると考えられた。また、免疫染色から、DMP1 は osteoid-OC では細胞内のゴルジ野に分布し、石灰化骨内の young-OC に移行すると細胞外基質に分布することから、OC 細胞外に分泌された DMP1 は石灰化に関与すると考えられた。

**O-53**

骨細胞の各分化ステージにおける DMP1 の発現・分布について

○大家 香織<sup>1,2</sup>、佐藤 淳<sup>1</sup>、野田 百合<sup>1</sup>、石田 健<sup>1</sup>、宇佐美 悠<sup>3</sup>、岸野 万伸<sup>1</sup>、小川 裕三<sup>1</sup>、小守 壽文<sup>4</sup>、豊澤 悟<sup>1</sup> (阪大 院歯 口腔病理、<sup>2</sup>阪大 院歯 口腔総合診療、<sup>3</sup>阪大 院歯 検査、<sup>4</sup>長大 院医歯薬 生命医科 細胞生物)

【目的】骨細胞 (OC) は、電子顕微鏡観察に基づいて、形態学的に osteoblastic-, osteoid-, young-, old-OC に分類されている。この分類に基づき、骨細胞における DMP1 の発現・分布を検討した。【方法】4 週齢の Wistar rat (♂) の脛骨を通法で固定、脱灰、パラフィン包埋、薄切を行った。同切片において、in situ hybridization にて DMP1 mRNA 発現を、免疫染色にて DMP1 分布を検討した。【結果】皮質骨では、DMP1 mRNA は osteoblastic-, osteoid-OC で強発現していたが、young-OC では発現が弱く、mature-OC ではほとんど発現を認めなかった。DMP1 蛋白は、osteoblastic-, osteoid-, young-OC のゴルジ野と、young-, Old-OC やそれらの骨細管周囲の骨基質に分布していたが、類骨に分布は認めなかった。海綿骨では、骨内の骨細胞に加えて、骨表層の紡錘形細胞に DMP1 mRNA 発現が認められ、DMP1 蛋白はそのゴルジ野や周囲骨基質に認められた。【結論と考察】未熟 OC は、DMP1 を盛んに合成・分泌するが、成熟 OC では合成・分泌は低下していた。海綿骨では、骨表層に DMP1 を合成・分泌する OC 様細胞が分布しており、RANKL 供給源の OC として機能的に重要なかもしれない。

**O-55**

骨治癒過程における骨髄由来細胞の関与

○河合 穂高<sup>1</sup>、辻極 秀次<sup>1</sup>、伊藤 聡<sup>1</sup>、中野 敬介<sup>2</sup>、于 崧<sup>1</sup>、川上 敏行<sup>3</sup>、長塚 仁<sup>1</sup> (岡大 院医歯薬 口腔病理、<sup>2</sup>松歯大 口腔病理、<sup>3</sup>松歯大 硬組織疾患病態解析)

【目的】骨折治癒過程では、炎症性細胞の浸潤、血管の侵入、幹細胞の動員など様々な細胞が複雑に関与する。しかしこれら骨折治癒過程に関わる細胞の由来については不明点が多い。そこで本研究では GFP マウス骨髄細胞移植マウスを用いて骨治癒モデルを作製し、骨治癒過程における骨髄由来細胞の関与について組織学的に検討した。【材料と方法】8 週齢雌性 C57BL/6 野生型マウスに放射線照射後、同系 GFP マウスから採取した骨髄細胞を尾静脈から移植した。細胞移植 1 ヶ月後に、骨治癒モデルとして脛骨に直径 1 mm の骨欠損を形成した。試料は 3、7、14、28 日後に摘出、パラフィン切片を作製し、HE 染色、TRAP 染色および GFP、F4/80、CD34、Osteocalcin (OC) に対する免疫組織化学的染色を施し組織学的に観察した。【結果と考察】骨欠損作製 3 日では創傷部炎症巣において炎症性細胞と F4/80 陽性のマクロファージに GFP 陽性が認められ、7 日では CD34 陽性血管内皮細胞の一部に GFP 陽性が認められた。14 日では新生骨周囲で OC 陽性 GFP 陰性の骨芽細胞が認められ、28 日では吸収した骨組織周囲に、TRAP 染色陽性 GFP 陽性の破骨細胞を認めた。以上のことから骨髄由来細胞は創傷治癒の促進、血管形成制御、骨組織のリモデリング等、新生骨形成のための微小環境形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

**O-56**

$\beta_2$ アドレナリン受容体作動薬がラット咬筋の生理機能および表現型に与える影響  
○大貫 芳樹<sup>1</sup>、奥村 敏<sup>1</sup>（鶴見大 歯 生理）

【目的】本研究では、脂溶性 $\beta_2$ アドレナリン受容体( $\beta_2$ -AR)作動薬クレンプテロール(CB)または水溶性 $\beta_2$ -AR作動薬サルブタモール(SB)の慢性投与がラット咬筋の筋活動量、筋線維サイズおよび筋線維タイプに与える影響を定量的に解析し、CBとSBの咬筋に対する作用を比較した。【方法】Wistar系ラットの右側咬筋に筋電図記録用電極を装着し、7、14日目(control)の筋活動をテレメトリーシステムにて24時間記録した。その後、CB投与を開始し、7、14日目の筋活動を同様に記録した。また、同様の手法を用いて、SB投与実験も行った。筋電図記録後、左側咬筋の筋線維直径を組織化学的手法にて、右側咬筋におけるミオシン重鎖アイソフォームの構成をSDS-PAGEにて定量的に解析した。【結果】CBおよびSBの慢性投与により、ラット咬筋の肥大と筋線維タイプの速筋化が観察された。また、CB投与により、咬筋のdaily duty time(1日あたりの活動時間)は、最大活動時の5および20%以上の活動レベルでは約2倍、50および80%以上の活動レベルでは約5倍増大した。しかしながら、SB投与は、咬筋のdaily duty timeには影響を与えなかった。【結論】以上の結果は、水溶性(SB)および脂溶性(CB)の $\beta_2$ -AR作動薬が末梢の咬筋 $\beta_2$ -AR刺激によりラット咬筋の肥大と筋線維タイプの速筋化を誘発するのに対し、脂溶性 $\beta_2$ -AR作動薬(CB)が中枢神経系の $\beta_2$ -AR刺激により筋活動量(daily duty time)の増大を誘発することを示唆する。

**O-57**

マウス筋芽細胞においてCCN2はBMP2による骨芽細胞様変化を抑制する  
○西田 崇<sup>1</sup>、久保田 聡<sup>1</sup>、滝川 正春<sup>1</sup>（岡大 院医歯薬 口腔生化）

以前の本学会で、我々はマウス筋芽細胞株C2C12を用いたBMP2によるアルカリホスファターゼ(ALP)陽性細胞数の増加にCCNファミリーメンバー2/結合組織成長因子(CCN2/CTGF)が協調的に関与する可能性を報告した。今回、胎生18.5日胚*Ccn2*欠損マウスから分離した筋芽細胞を用いてBMP2による骨芽細胞様変化にCCN2がどのような影響を与えるかを解析した。同腹の野生型及び*Ccn2*欠損マウスから分離した筋芽細胞をサブコンフルエントに達するまで培養した後、BMP2を含む無血清培地に交換した。4日後にALP染色を行うと、*Ccn2*欠損筋芽細胞のALP染色のレベルは野生型筋芽細胞よりも亢進した。この結果はCCN2がBMP2による骨芽細胞様変化に抑制的に作用することを示唆しており、以前のC2C12細胞で得た結果とは一致しなかった。そこでC2C12細胞においてもCCN2がBMP2作用を抑制するかを確かめるためにBMP2とCCN2共存下でBMP2/4産生量の増減を解析した結果、BMP2単独刺激で増加したBMP2/4の産生量は、共存するCCN2の濃度を高めることで逆に減少した。この結果はC2C12細胞においてもCCN2がBMP2作用を抑制することを示しており、CCN2が筋芽細胞においてBMP2のアнтаゴニストとして機能する可能性が考えられた。会員外共同研究者：Janune D., Lyons KM.

**O-58**

遊離脂肪酸は気管平滑筋上の遊離脂肪酸受容体FFAR1を介して気管収縮を促進させる  
○水田 健太郎<sup>1,2</sup>、工藤 忠明<sup>3</sup>（東北大 院歯 歯科口腔麻酔、<sup>2</sup>コロムビア大 医 麻酔、<sup>3</sup>東北大 院歯 口腔生理）

【目的】肥満者は気管支喘息の有病率が高い。肥満が気管支喘息を誘発する機序については諸説あるものの、確たる証左は得られていない。近年我々は、中長鎖遊離脂肪酸をリガンドとするG<sub>q</sub>蛋白共役型遊離脂肪酸受容体FFAR1(GPR40)の、気管平滑筋上での発現を確認した。そこで、肥満者の血中に過剰に存在する遊離脂肪酸が、肥満と気管支喘息を繋ぐ鍵分子であるとの仮説を基に、FFAR1を介した気管平滑筋収縮作用について検討した。【方法】アセチルコリン誘発性のモルモット気管平滑筋収縮作用が、遊離脂肪酸(オレイン酸、リノレン酸)またはFFAR1作動薬(GW9508)の投与により増強されるかを、オーガンバス法で検討した。また、FFAR1を介したヒト気管平滑筋細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)上昇作用を、Ca<sup>2+</sup>蛍光試薬(Fluo-4AM)負荷細胞にて評価した。【結果】アセチルコリン誘発性の気管平滑筋収縮作用は、FFAR1リガンド投与により増強した。ヒト気管平滑筋細胞へのFFAR1リガンド投与により、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が一過性に上昇した。また、この反応は(1)siRNAによるFFAR1のノックダウン、(2)PLC阻害剤(U73122)、(3)IP<sub>3</sub>受容体拮抗薬(Xestospongine C)により有意に抑制された。【考察】気管平滑筋に発現しているFFAR1は、気管収縮に関与することが示唆された。FFAR1は、肥満と気管支喘息を関連づける因子である可能性がある。

**O-59**

生後マウスの咬筋と大腿の筋における甲状腺ホルモンレセプターと筋分化抑制因子との関係  
○佐藤 巖<sup>1</sup>、三輪 容子<sup>1</sup>、春原 正隆<sup>1</sup>（日歯大 生命歯 解剖1）

【目的】筋線維初期分化マーカーにはMRFsファミリーなどの因子があり(Sabourin and Rudnicki 2000)、これらの筋分化促進因子の抑制因子としてミオスタチンの存在が報告された(Manceau et al., 2008)。骨や筋の成長期をコントロールする因子として甲状腺ホルモンの関与があるが、その受容体である $\alpha$ 、 $\beta$ の2種類とサブタイプの2つがあるが $\alpha 1$ は主に筋に発現し(White et al., 2001)、生後の筋線維タイプの構成に関係することが報告されている(Pircher et al., 2005)。しかし筋分化促進因子の抑制因子であるミオスタチンとの関係は十分検討されていない。【方法】本研究では生後から2週間のマウス咬筋と大腿の筋を比較してmRNAの発現レベルでの検討を行った。【結果】咬筋の $\alpha 1$ は6日齢まで増加し、大腿の筋では生後から急激に減少した。この傾向は大腿の筋と比べ咬筋のサイトクロームCの発現パターンと類似し、ミオスタチンの発現パターンとは異なることが示された。しかし、10週齢以降には筋関連因子(ミオシン重鎖、slow fiber, embryonic fiber)の増加し対してミオスタチンと $\alpha 1$ とは減少する傾向を示した。【考察】このことから咬筋では生後に両者を運動して制御する因子の可能性が示唆された。

**O-60**

Expression of erythropoietin receptor on stem cells from exfoliated deciduous teeth

○馬 蘭<sup>1,2</sup>、山座 孝義<sup>2</sup>、星野 慶弘<sup>1</sup>、山座 治義<sup>1</sup>、野中 和明<sup>1</sup>、久木田 敏夫<sup>2</sup> (<sup>1</sup>九大 院歯小児口腔医学、<sup>2</sup>九大 院歯 分子口腔解剖)

[Purpose] Erythropoietin (EPO) is known as a hormone to control erythropoiesis. Recent discovery demonstrated that EPO affects a function on bone marrow mesenchymal stem cells through its receptor EPO-receptor (EPO-R). However the expression and function of EPO-R on dental pulp-derived stem cells have not been elucidated. Here, we demonstrate the expression of EPO-R on stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) and show its functionality in SHED. [Method] SHED were isolated from dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth and cultured. The expression of EPO-R was analyzed by molecular biochemical, biochemical, and morphological analyses. [Results] Reverse transcription polymerase-chain reaction analysis showed the expression of EPO-R gene on SHED. Western blotting, flow cytometry and immunostaining demonstrated the localization of EPO-R on SHED. Furthermore, when SHED treated with EPO-R ligand EPO, SHED expressed an enhanced capacity of cell proliferation. [Conclusion] These findings indicated that EPO-R may play an important role of a stem cell function of SHED and suggested that EPO may be useful to regulate a function of SHED.

**O-61**

ヒト歯髄幹細胞のドーパミン神経細胞への分化誘導とパーキンソン病モデルへの移植による治療有用性

○藤井 裕美<sup>1</sup>、山本 朗仁<sup>1</sup>、松原 弘記<sup>1</sup>、上田 実<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名大 院医 顎顔面外科)

パーキンソン病は、脳のドーパミン作動性ニューロンの変性により線条体のドーパミン放出量が減少することで起こる神経変性疾患である。特定の神経細胞の機能障害が原因であるため、ドーパミン産生能を持つ幹細胞移植治療が近年注目されている。ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞 (SHED) は高い細胞増殖率を示す神経堤由来の幹細胞である。5 継代目では、ほぼ全ての SHED が神経幹細胞および前駆細胞マーカーを共発現する。さらに神経幹細胞のようにニューロンやグリアへの分化能を示す。我々はこれまでの研究で SHED を約 70% の割合で効率的にドーパミン産生ニューロンに分化誘導する方法を見出した。分化誘導過程で生じる SHED の細胞死は低酸素培養にて著しく改善した。分化誘導した 1x10<sup>5</sup> 個の SHED (d-SHED) は KCl 刺激に反応し培養液中に 46 ng/ml 時の効率でドーパミンを産生した。さらに d-SHED を 6-OHDA 片側注入によって誘導したパーキンソン病モデルラットへ移植した結果、パーキンソン病特有の回転運動が有意に抑制され、行動機能が改善した。組織学的解析によって移植後 6 週における d-SHED の生存率は 0.1% であった。以上の結果から、d-SHED はパーキンソン病治療に対する移植細胞として優れた細胞であることが示唆された。

**O-62**

三次元培養による培養腱細胞 (テノサイト) 単離法の確立

○島田 明美<sup>1</sup>、和田 悟史<sup>2</sup>、小松 浩一郎<sup>1</sup>、中島 和久<sup>1</sup>、二藤 彰<sup>1</sup> (<sup>1</sup>鶴見大 歯 薬理、<sup>2</sup>鶴見大 歯 矯正)

遺伝子改変マウス等の腱や靭帯の性質を解析する上で、腱および靭帯細胞の初代培養系は有用であるが、マウス腱および靭帯細胞の初代培養法は確立されていない。そこで今回、コラーゲン培養により安定的に腱細胞 (テノサイト) を培養する方法を確立し、得られた初代培養腱細胞の性質を調べた。成体マウスのアキレス腱ならびに尾腱を採取し、0.1% コラーゲンゲル (Cellmatrix type I-A、新田ゼラチン) 中で 10% ウシ胎児血清を含む  $\alpha$ MEM で培養した。約 10 日後、ゲル中に出現した増殖細胞を、コラーゲンマーゼとトリプシン処理により分離し、通常のプラスチックシャーレで継代培養した。増殖速度を調べると共に、発現遺伝子をリアルタイム PCR 法により調べた。腱組織採取直後から二次元で培養した場合と比べて、三次元培養では細胞の出現時期が早かった。三次元培養後にプラスチックシャーレ上で継代した際の細胞増殖速度も約 1.3 倍速かった。また、対数増殖期の増殖回数や得られた総細胞数がかかるに多かった。テノサイトマーカーである Scleraxis や Tenomodulin の遺伝子発現が多く、筋細胞マーカーの myogenin や骨芽細胞マーカーの Osteocalcin 等を検出できなかったことから、大部分が腱細胞であると考えられた。本研究により、三次元培養を用いて純度の高い腱細胞を安定的に単離培養できることが示された。

**O-63**

上皮・間葉ハイブリッド型細胞シート合成過程に発現する細胞骨格関連タンパク

○山根 茂樹<sup>1</sup>、梅澤 貴志<sup>1</sup>、井出 吉信<sup>1</sup>、阿部 伸一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東歯大 歯 解剖)

【目的】咽頭癌などによる粘膜摘出後に自己細胞による口腔粘膜細胞シートの応用が試みられているが、筋層の再構築までは困難なことから治療後の咀嚼・嚥下機能障害という問題点が指摘されている。そこで上皮、結合組織、筋肉の細胞シートをハイブリッドさせた 3 層積層シートを開発し、これらの構造維持に重要な細胞骨格、接着タンパクの局在、継日的な変化を検討した。【方法】上皮シート作成のため、日本家兎口腔粘膜から細胞を採取した。同時に酵素処理により分離した結合組織由来の細胞をゲル状のコラーゲンと混和し、インサート上に播種した。この結合組織ゲル上に口腔粘膜上皮細胞を共培養した。筋シートは日本家兎の筋芽細胞を用いて作成し、両シートを積層後、継日的に凍結切片を作成し、免疫組織化学的染色を行った。さらにタンパクの定量化のため、Western blot 法を行った。また、間葉系細胞や筋芽細胞の性質を調べるために分化誘導を行った。【結果】上皮シートが結合組織ゲルを介して、筋肉シートと密接な状態であり、それぞれの細胞骨格関連タンパクなどが観察され、筋組織特有の構造タンパクであるデスミンが、積層後継日的に増加していた。また繊維芽細胞、筋芽細胞には、骨芽細胞、脂肪細胞に分化できる未分化な細胞が存在していた。以上のことから、今回作製を試みた積層シートは、移植後も増殖が期待出来る未分化な細胞を含んだ良好な積層シートである可能性が示唆された。

**O-64**

Simvastatin がマウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響  
 ○大川 博子<sup>1</sup>、江草 宏<sup>1</sup>、矢谷 博文<sup>1</sup> (阪大院歯 クラウンブリッジ補綴)

**【目的】**本研究の目的は、simvastatin が iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討することである。**【方法】**成体マウスから分離培養した歯肉線維芽細胞を用いて作製した iPS 細胞 (mGF-iPSCs) を、1 μM simvastatin 含有骨芽細胞分化誘導培地にて 28 日間培養し、RT-PCR 解析を用いて骨芽細胞分化特異的遺伝子 (osteocalcin, collagen 1, osterix) の発現を検討するとともに、Alizalin Red 染色により細胞外基質の石灰化を観察した。また、simvastatin の mGF-iPSCs に対する細胞毒性および増殖能に及ぼす影響を、WST-1 細胞増殖および細胞生存アッセイを用いて検討した。さらに、mGF-iPSCs の三次元細胞凝集体を作製し、1 μM simvastatin 含有骨芽細胞分化誘導培地にて 30 日間分化誘導後、SCID マウス皮下へ移植した。移植 28 日後に、移植細胞による異所性の骨形成を組織学的に評価した。**【結果】**simvastatin は、mGF-iPSCs の骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現および細胞外基質の石灰化を著明に促進した。また、simvastatin は 0.01-1 μM の濃度範囲で mGF-iPSCs の増殖を濃度依存的に抑制した。さらに、simvastatin 存在下で骨芽細胞へ分化誘導した細胞移植体の内部には、非添加の場合と比較してより成熟した骨組織の形成を認めた。**【結論】**本研究の結果、simvastatin は mGF-iPSCs の骨芽細胞分化を促進し、mGF-iPSCs による異所性骨形成を促進することが明らかとなった。

**O-66**

軟骨細胞と変形性関節症モデルを用いた CCN2 各モジュールの組織再生効果の評価  
 ○Abd El Kader Tarek<sup>1,2</sup>、久保田 聡<sup>1</sup>、西田 崇<sup>1</sup>、服部 高子<sup>1</sup>、青山 絵里子<sup>3</sup>、Janune Danilo<sup>1</sup>、窪木 拓男<sup>2</sup>、滝川 正春<sup>1,3</sup> (1岡大院歯歯薬 生化、2岡大院歯歯薬 インプラント再生、3岡大機能共研施設)

CCN2/CTGF promotes the regeneration of articular cartilage. This study aims to assess the effects of 4 modules comprising this protein independently or different combinations. The effects in vitro were evaluated using human chondrocytic HCS-2/8 cells. Cartilage regeneration in vivo was evaluated by using 2 rat OA models. Interaction of 2 modules was examined by an SPR methodology. Analysis with HCS-2/8 cells revealed an activity comparable to rCCN2 in one module, which was rather diminished by the combination with other modules. However interestingly, mixture of all of the 4 modules almost reconstructed the bioactivity of rCCN2. The result of cartilage regeneration experiments was also consistent with the findings obtained in vitro. SPR analysis uncovered significant interaction of 2 modules and full-length CCN2, indicating possible multimodular complex formation. These results indicate independent bioactivity of each module, also indicating the complexity of inter-modular interaction in regulating the bioactivity of CCN2.

**O-65**

Effectiveness of Enzymatically Synthesized Glycogen (ESG) on the healing process following intentionally-delayed tooth replantation in mice  
 ○Quispe-Salcedo Angela<sup>1</sup>、依田 浩子<sup>1</sup>、大島 勇人<sup>1</sup> (1新大院歯歯 硬組織形態)

**Objective:** Enzymatically synthesized glycogen (ESG) has been found to improve the immune response by stimulating the macrophage activity. The present study aimed to clarify the effectiveness of ESG on the healing process following intentionally-delayed tooth replantation in mice.

**Materials and methods:** The upper right first molars of 3-weeks-old ICR mice were extracted and immersed in three ESG solutions of different molecular weight (20000, 5000, and 3000 kDa.) for 60 minutes, in addition to PBS alone (control). The progression of the pulpal healing was assessed by immunohistochemistry for nestin, PGP 9.5 and Ki-67, and TUNEL assay.

**Results:** An increased number of TUNEL + cells occupied the dental pulp of both groups one week after operation. In the PBS group, cell proliferation took place at Week 2, while in the ESG groups Ki-67 + cells significantly decreased in number due to the establishment of the dental pulp healing patterns.

**Conclusion:** ESG improved the healing process by stimulating the differentiation of hard-tissue forming cells in the dental pulp of intentionally-delayed replanted teeth without affecting the supporting tissues.

**O-67**

灯心草および牡丹皮エキスはシ正常唾液腺房細胞をシスプラチンによるアポトーシスから保護する  
 ○椋代 義樹<sup>1</sup> (1昭大 歯 口腔外科)

**【目的】**シスプラチン (CDDP) は悪性腫瘍の化学療法剤として用いられるが、重篤な副作用がある。その一つである口腔乾燥症は唾液腺房細胞の細胞死によって引き起こされ、患者の Quality of Life を低下させる課題となっている。そこで本研究では、CDDP による唾液腺房へのアポトーシスを保護する生薬の検索を *in vitro* で試みた。

**【方法】**不死化ヒト正常唾液腺房細胞株である NS-SV-Ac 細胞を生薬エキと CDDP 存在下で培養し、細胞死 (アポトーシス) 抑制効果を検索した。さらに、アポトーシス抑制効果の詳細を検討した。また同様の実験を、ヒト腺様嚢胞癌細胞株である、Acc 2 および Acc M 細胞でも行った。

**【結果】**灯心草 (*Juncus effusus*) および牡丹皮 (*Paeonia suffruticosa*) の二種類のエキスは、NS-SV-Ac 細胞の CDDP による細胞死 (アポトーシス) を抑制した。この作用機序は PKB/Akt 1 のリン酸化によって、Bcl-2/Bax 経路でカスパーゼ 3/7 の活性を抑制していた。一方、これらの効果は Acc 2 および Acc M 細胞では見られなかった。**【考察】**本研究により、抗癌剤投与中の患者における口腔乾燥症を改善する生薬エキスを見出した。現在、*in vivo* 実験を行っている。

会員外演者：新谷悟、近藤誠二 (昭大歯学部顎口腔疾患制御外科学講座)、小山智之、矢澤一良 (東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科ヘルスフード科学講座)、Chunnan Li (Medical College, Jinggangshan University, P.R. China)

O-68

*In vitro* におけるマウス顎下腺の時計遺伝子、時計制御遺伝子と機能分子 mRNA の概日リズム  
 ○内田 仁司<sup>1,2,3</sup>、阪井 丘芳<sup>2</sup>、中村 渉<sup>1</sup> (大阪  
 院歯 口腔時間生物、<sup>2</sup>大阪 院歯 顎治、<sup>3</sup>日本  
 学術振興会)

唾液は摂食等の刺激により分泌量が増加する。一方、安静時唾液量は1日の時刻に応じて変化する。しかし、その日内変動の制御機構は明らかでない。本研究では、マウス顎下腺の遺伝子発現の時間変動を個体及び培養組織と比較検討し、唾液腺機能リズムの生じる機構を解明することを目的とした。概日リズムの測定は時計遺伝子 *Per2* 発光レポーターマウスから顎下腺を摘出して器官培養し、生物発光を連続的に記録した。マウス顎下腺 *PER2* 発現量は明瞭な概日リズムを示したが、1週間の測定期間中にリズム振幅が減衰した。次に、マウス顎下腺を培養し24時間で6時間毎にサンプリングし、時計遺伝子 *Per2*, *Bmal1*, 時計制御遺伝子 *Dbp*, 機能分子 *Aqp5*, *Amy* の mRNA 量を定量して *in vitro* における発現変動を検討した。時計遺伝子 mRNA の発現量は明瞭な概日変動を示した。*Aqp5* と *Amy* mRNA も概日変動を示し、それらの発現タイミングは *Dbp* と同期していた。更に、マウス個体から4時間毎に24時間、各点で顎下腺を採取し、*in vivo* における mRNA 発現を定量して *in vitro* の発現リズムと比較した。*In vivo* において顎下腺の時計遺伝子 mRNA 発現は概日リズムを示した。一方、*Aqp5* mRNA は概日リズムを示したが、発現量のピークはマウスの活動期である夜間に位置し、*Amy* mRNA は概日リズムを示さなかった。以上の結果から、顎下腺機能の概日リズムは顎下腺自体の概日リズムをベースにして、中枢性の制御を受けていると考えられた。

O-70

災害時拘束ストレスを唾液タンパク質の酸化により測定する試み  
 ○谷口 紀江<sup>1</sup>、飯塚 純子<sup>2</sup>、向井 義晴<sup>2</sup>、高垣 裕子<sup>1</sup> (神歯大 院 硬組織分子細胞生物、<sup>2</sup>神歯大 院 う蝕制御修復)

【目的】大規模災害などによる避難所生活は、避難者に様々なストレスを与える。その様な状況下特に大きなストレスを受けている人を識別する簡便な方法があれば、個別の対処が可能になる。既に報告した Raman 分光法による全唾液タンパク質の酸化定量法を応用し、唾液提供者のストレスを評価する検査法を提唱したい。【対象と方法】本学病院の女性教職員数名に、金曜日から日曜日まで周囲を段ボールで囲まれた一畳のスペースで過ごし、粗食をとり、寝袋で休む実験を依頼した。事前と1、2日目の3回、安静時と刺激時の唾液を採取し、唾液タンパク質の酸化防止のために N2 置換を行い、各種阻害剤を添加した。一週間冷蔵保管後唾液を遠心分離し、上清をエタノール沈殿により濃縮後圧延し、Raman 分光法によりタンパク質 Amidel に対する SS 基のピーク面積比から酸化状態を比較検討した。又別途平日に3日間連続で唾液を採取し、被験者のコントロール値とした。【結果と考察】顔見知りと連れ立って参加した被験者は、実験前と比較して模擬避難所生活1、2日目に、安静時、刺激時唾液共 SS 基/Amidel 比に減少が見られるか変化がなかった。一方単独で参加した被験者は、1、2日目共刺激時唾液のみに有意な面積比の増加がみられた。以上から、刺激時唾液の酸化力がストレスにより高まり、唾液タンパク質を強く酸化した可能性が推測された。更なる検討と、ボランティア集団の構成を吟味する必要がある。

O-69

唾液腺介在部導管細胞は CD117 と CD66a を指標として分離できる  
 ○竹山 旭<sup>1</sup>、吉川 美弘<sup>2</sup>、池尾 隆<sup>2</sup>、森田 章介<sup>1</sup>、檜枝 洋記<sup>3</sup> (大歯大 院歯 口腔外科1、<sup>2</sup>大歯大 院 生化、<sup>3</sup>大歯大 院 生物)

【目的】唾液分泌障害の根本的治療法として幹細胞を利用した再生医療が期待されている。唾液腺上皮幹細胞は介在部や排出部導管に存在するが、唾液腺構成細胞を分離する方法が確立されていないため、詳しい性状はわかっていない。本研究では、細胞表面分子 CD117 と CD66a が唾液腺構成細胞を系統的に分離するための有用なマーカーであることを報告する。【材料・方法】成体マウス顎下腺の凍結組織切片および単一細胞標本を CD117、CD66a、腺房マーカー AQP5、導管マーカー CLDN4、基底・筋上皮マーカー CK5 に対する抗体および蛍光標識2次抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡観察および FACS 解析を行った。動物実験は大歯大動物実験規定に従った。【結果】顎下腺の腺房、介在部導管、線条/排出部導管の各細胞、そして基底・筋上皮細胞では CD117 と CD66a の染色強度が異なっていた。介在部導管細胞は CD117 + CD66aHi、線条・排出部導管の一部の細胞は CD117 + CD66aLo であり、これらの細胞を FACS 分離できた。【結論】唾液腺上皮幹細胞の存在部位である介在部導管および線条・排出部導管の細胞を、生きたまま分離することに成功した。これらの細胞の分化能や唾液腺再生能、発現遺伝子を調べることによって、唾液腺幹細胞の性質を詳細に解析することが可能となり、唾液腺再生医療の確立に大きく貢献することが期待される。

O-71

唾液 BDNF・エストロゲン・プロゲステロンの相関と性周期との関連  
 ○松木 千紗<sup>1</sup>、近藤 裕介<sup>1,2</sup>、猿田 樹理<sup>1</sup>、東雅啓<sup>1</sup>、林 隆司<sup>1</sup>、山本 裕子<sup>1</sup>、清水 智子<sup>1</sup>、榎木 恵一<sup>1</sup> (神歯大 院 環境病理、<sup>2</sup>東海大 医 病理診断)

【目的】健康な女性には毎月一定の周期で月経がおこる。この月経周期に基づいた周期を性周期と呼びこれは2種類のホルモン、エストロゲンとプロゲステロンの変化によってもたらされる。過去の報告で唾液中のプロゲステロンとエストラジオールは、血漿プロゲステロン、血漿エストラジオールと相関することが報告されている。さらに血漿プロゲステロンと血漿エストロゲンは BDNF と相関することも報告されている。これらから唾液中において brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は、プロゲステロンあるいはエストロゲンと相関するという仮説の基に検討を行った。【方法】52名の女性に事前に性周期などのアンケートによる調査を行い、また唾液回収にはサリベットを使用し、5分間安静時唾液を採取し遠心分離後にサンプルとして使用した。その後エストロゲン、プロゲステロン、BDNF の唾液中の濃度を ELISA により通法に従い測定し、相関関係を統計的に検討した。【結果と考察】52名の平均年齢は 21.8 歳、BMI19.3、体温 35.6 度、月経周期 28.3 日であった。また月経期であった者は 10 名、非月経期であった者は 42 名であった。ELISA の結果より、唾液 BDNF と唾液エストロゲンの濃度に強い相関があることがわかった。今後唾液 BDNF と唾液エストロゲンの月単位における個人レベルでの相関関係を解析し、唾液を用いて健康な状態はもちろん、婦人科系疾患の診断に活用できるよう研究を進めていきたい。

**O-72**

各種ルミナコイド摂取がラット顎下腺と唾液中 IgA 量に与える影響についての検討

○山本 裕子<sup>1</sup>、林 隆司<sup>1</sup>、東 雅啓<sup>1</sup>、清水 智子<sup>1</sup>、猿田 樹理<sup>1</sup>、近藤 裕介<sup>1,2</sup>、槻木 恵一<sup>1</sup> (神歯大 環境病理、<sup>2</sup>東海大 医 病理診断)

【目的】唾液中には炎症の無い状態でも多量の sIgA が分泌されており、上気道感染症の感染防止に大きく関与している可能性がある。ヒトでは特定の食物摂取で唾液中 sIgA 量が増えたとの報告はあるが、そのメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では腸管からのシグナルが唾液中 sIgA 量に与える影響を研究するため、ラットにルミナコイド（食物繊維。難消化性糖質）を摂取させることで、盲腸内容物中だけでなく顎下腺および唾液中における IgA 量が変動するかどうかを検討した。【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飼料を対照飼料として、5.0% フラクトオリゴ糖添加飼料、2.5% ポリデキストロース 2.5% ラクトール添加飼料を調整した。Wistar 系ラット（オス、5 週令）を 3 群に分け、各飼料を自由摂取させ、3 週間後に顎下腺、盲腸内容物、血清を採取した。別の実験では同じ条件の下、ラット唾液を採取した。IgA 量は ELISA 法にて測定した【結果と考察】盲腸内容物と顎下腺組織の IgA 量は、ルミナコイド摂取群で、コントロール摂取群に比較して高い値が認められた。血清 IgA 量は 3 群間で差は認められなかった。また唾液中 IgA 量もルミナコイド摂取群において高い値が認められた。以上の結果から、各種ルミナコイド摂取がラット盲腸内容物、顎下腺および唾液中で IgA 量を増加させる可能性が示唆された。また顎下腺 IgA 量、唾液 IgA 量は血液中 IgA 量とは関連が薄いと考えられる。

**O-74**

新規 NF-κB 選択的阻害剤は口腔癌による顎骨浸潤を抑制する

○多田 幸代<sup>1,2</sup>、福島 秀文<sup>2</sup>、大澤 賢次<sup>3</sup>、自見 英治郎<sup>2</sup> (<sup>1</sup>九歯大 歯 歯科侵襲制御、<sup>2</sup>九歯大 歯 分子情報生化学、<sup>3</sup>埼玉大 病態生理)

癌組織では恒常的に転写因子 NF-κB が活性化することが報告されている。我々は以前本学会において、マウス口腔扁平上皮癌 (OSCC) 顎骨浸潤モデルに対し、NF-κB の選択的阻害剤 (NBD ペプチド) を局所投与すると、顎骨浸潤が抑制されることを報告した。そこで本研究では新規 NF-κB の選択的阻害剤を用いて OSCC による顎骨浸潤抑制の分子メカニズムを解明する目的で実験をおこなった。ヒトおよびマウスの OSCC 細胞株を TNFα で刺激すると、NF-κB のメインサブユニットである p65 のリン酸化、核移行と IκBα の分解が観察されたが、新規 NF-κB 阻害剤 IMD-0560 で前処理した後に TNFα で刺激すると、p65 のリン酸化、核移行と IκBα の分解は抑制された。また、IMD-0560 は TNFα 刺激によるマトリクスメタロプロテアーゼの基質分解活性と OSCC 細胞の浸潤能の活性化を抑制した。次にマウス OSCC 顎骨浸潤モデルにおいて、IMD-0560 (5 mg/kg) を週 3 回、3 週間癌細胞接種部位に局所投与すると、IMD-0560 は腫瘍の増殖と顎骨浸潤を著明に抑制した。以上の結果から、IMD-0560 は OSCC の NF-κB の活性化を抑制し、OSCC 細胞の増殖と基質分解活性を抑制し、顎骨浸潤を抑制していると考えられる。【会員外共同研究者】医薬分子設計研究所：板井昭子、藤川知行

**O-73**

Tumor associated macrophage におけるアシル基転移酵素群の役割

○谷口 広祐<sup>1,3</sup>、引地 尚子<sup>2</sup>、沖永 敏則<sup>3</sup>、西原 達次<sup>3</sup> (<sup>1</sup>九歯大 口腔顎顔面外科、<sup>2</sup>九歯大 口腔保健 口腔機能支援、<sup>3</sup>九歯大 健康増進 感染分子生物)

【目的】アシル基転移酵素群は近年発見された膜タンパクで、PGE2 をはじめとする炎症性脂質メディエーター産生および細胞膜構成の調節を司る酵素であることが解明されてきた。悪性腫瘍間質に浸潤する腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage 以下 TAM) は LPS 刺激により腫瘍抑制を行う M1-like macrophage (以下 M1) と IL-4 刺激により腫瘍増殖・転移促進を行う M2-like macrophage (以下 M2) の 2 種に分化することが知られている。本研究では、TAM の分化過程におけるアシル基転移酵素群の mRNA 発現の変化について検討した。【方法】ヒト単球系細胞株 U937 細胞を PMA 処理した後 LPS あるいは IL-4 で刺激し、細胞の形態を観察した。その後細胞を回収し M1・M2 それぞれの分化マーカーおよびアシル基転移酵素群の遺伝子発現を qRT-PCR で確認した。【結果】PMA 処理を行うと、浮遊系の U937 細胞は培養皿に付着し著明な細胞増殖は認められなくなった。さらに M1、M2 は細胞全体が大きくなり明らかな形態的变化を認めた。次に、PMA 処置後 LPS 刺激で M1 マーカー、および IL-4 刺激で M2 マーカーの遺伝子発現が上昇した。また、一部のアシル基転移酵素群の遺伝子発現上昇を認めた。【考察】TAM の分化とアシル基転移酵素群の変化に関連性が見とれた。すなわち、TAM の分化により、細胞膜構成に変化が生じたり、炎症性脂質メディエーター産生量に変化が生じたりする可能性が示唆された。

**O-75**

乳癌骨転移巣における骨細胞産生因子の組織化学的解析

○山田 珠希<sup>1</sup>、坪井 香奈子<sup>1</sup>、平賀 徹<sup>3</sup>、山本 知真也<sup>1</sup>、田中 祐介<sup>1</sup>、長谷川 智香<sup>1</sup>、織田 公光<sup>2</sup>、網塚 憲生<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北大 院歯 硬組織発生生物、<sup>2</sup>新大 院医歯 口腔生化学、<sup>3</sup>松歯大 口腔解剖二)

【目的】骨細胞は基質ミネラルの維持、骨改造及び血中リン濃度の調節を行なっているが、癌の骨転移巣という特殊な環境は骨細胞の機能に影響を与えると考えられる。そこで我々は、乳癌骨転移モデルを用いて、骨転移巣における骨細胞産生因子について組織化学的に検索することを目的とした。【材料及び方法】生後 9 週齢の雌性 nu/nu マウスの左心室に乳癌細胞 (MDA-MB-231) 浮遊液を注入した。28 日後、軟エックス線にて骨破壊像を確認後、4% パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定し、通法にてパラフィン包埋を行った。大腿骨の組織切片を作製し、骨細胞産生因子である DMP-1、FGF23 と sclerostin 及び骨芽細胞と破骨細胞マーカーである ALP と TRAP について組織化学的に解析した。【結果と考察】乳癌細胞が転移した周囲の骨基質表面には、多数の ALP 陽性骨芽細胞及び TRAP 陽性破骨細胞が局在した。乳癌転移巣に隣接する皮質骨内の骨細胞は DMP-1 陽性であったが、FGF23 及び sclerostin ともに陰性を示した。一方、骨転移巣における乳癌細胞は FGF23 強陽性を示した。以上、乳癌細胞は FGF23 を過剰産生することで低リン環境という骨転移に最適な環境を形成する可能性、また、周囲の骨細胞の機能を抑制する可能性が示唆された。

**O-76**

正常ヒト上皮角化細胞における酸化ストレスに対する発がん防御機構としての細胞老化誘導作用  
 ○佐々木 三奈<sup>1,2</sup>、鍛冶屋 浩<sup>1</sup>、長岡 良礼<sup>1,2</sup>、堤 貴司<sup>1</sup>、府川 晃久<sup>1,2</sup>、岡本 富士雄<sup>1</sup>、岡部 幸司<sup>1</sup> (福歯大 細胞生物、<sup>2</sup>福歯大 顎顔面外科)

【目的】酸化ストレスは突然変異や発がんを誘発する要因であり、この防御機構としてテロメアの短縮化を伴わない正常細胞の細胞老化が知られている。しかし、口腔粘膜の酸化ストレスに対する細胞老化の誘導については不明である。そこで、活性酸素種(ROS)に対するヒト正常角化上皮細胞(NHEK)と口腔扁平上皮癌細胞(SCC)の細胞老化の誘導とその機序について検討した。【方法】過酸化水素水を用いたROS刺激をNHEK細胞及びSCC細胞に与えた。ROS刺激による標的分子の発現をDNAマイクロアレイ法、SA-β-gal染色、RT-PCR法、Western blotting法を用いて検討した。【結果】ROS刺激はNHEKにおいて老化マーカーであるSA-β-galの活性化と共にがん抑制遺伝子(p21, p16)の発現の上昇とサイクリン依存性キナーゼ4/6の発現が減少した。一方、SCC細胞の細胞老化に関連する遺伝子の発現変化はなかった。さらに、メチル化阻害剤の5-azacytidineを用いてNHEK細胞を刺激するとROS刺激と同様なp16の発現上昇とSA-β-gal活性化を認めた。【結論】酸化ストレスに対する発がん防御機構としてがん抑制遺伝子の発現を介した細胞老化の誘導が一因と考えられた。さらに、このROS刺激による細胞老化には正常細胞にのみ惹起されるがん抑制遺伝子のメチル化抑制が関与する可能性が示唆された。

**O-77**

CN3の抗線維化効果に伴うCCNファミリー遺伝子発現プロファイルの変化  
 ○Janune Danilo<sup>1</sup>、Tarek Abd El Kader<sup>1,2</sup>、久保田 聡<sup>1</sup>、西田 崇<sup>1</sup>、服部 高子<sup>1</sup>、青山 絵里子<sup>3</sup>、窪木 拓男<sup>2</sup>、滝川 正春<sup>1,3</sup> (福大 院医歯薬 口腔生化、<sup>2</sup>福大 院医歯薬 インプラント再生、<sup>3</sup>福大 中央研究施設)

CN2とCN3は、高い構造類似性を示すCCNファミリーに属するタンパク質である。CN2が様々な組織において線維形成を促進する因子であることは以前から知られている一方、CN3は特定の組織において線維形成を防御することも報告されている。実際腎臓においてはCN3がCN2発現を抑えながら線維形成を防御する作用を果たすが、肝臓の細胞においては別のメカニズムを経由して線維化を抑制する。このようにCN3が抗線維化効果を発揮するメカニズムには未だ不明な点が多い。そこで本研究ではin vitro線維化モデルを利用して、CCNタンパクファミリーの全メンバーおよび線維化のマーカー遺伝子に対するCN3過剰発現の効果を評価した。その結果、CN2遺伝子発現に一定の低下がみられ、I型コラーゲンとα平滑筋アクチン遺伝子発現の有意な抑制がみられた。注目すべきはCN3過剰発現の遺伝子発現抑制効果は、線維化のマーカー遺伝子とCN2遺伝子だけに限らずCN4遺伝子にまで及んだ点である。本研究で得られた結果は、線維化という病的な組織リモデリング現象が、CCNファミリータンパク質が構成する複雑な分子ネットワークに制御されていることを示している。

**O-78**

低カルボキシル化オステオカルシンはインクレチン分泌を介してインスリン分泌を促進する  
 ○溝上 顕子<sup>1</sup>、安武 雄<sup>1</sup>、平田 雅人<sup>1</sup> (九大 院歯 口腔細胞工)

骨芽細胞が合成・分泌するオステオカルシン(OC)は、大部分は骨基質成分として骨に埋め込まれているが、一部は血中に放出される。血中OCには、グルタミン酸残基がγ-カルボキシル化されたもの(GlaOC)と低カルボキシル化状態のもの(ucOC)の2つの型がある。そのうちucOCがインスリン分泌を促すことが報告された。一方、インクレチン、GLP-1もインスリン分泌を促す。GLP-1は小腸上皮粘膜細胞から分泌されるが、血糖依存的にインスリン分泌を促すため低血糖発作を起こしにくいことが知られる。マウス小腸上皮細胞由来STC-1細胞及びマウス小腸上皮細胞はucOC受容体、Gprc6aが発現していた。STC-1をucOCで刺激するとGLP-1の分泌が惹起されたが、GlaOCは無効であった。マウスの腹腔内や静脈内にucOCを投与すると血中のGLP-1が上昇したが、GlaOCはここでも無効であった。経口投与するとucOCに加えて、GlaOCでも同様の効果が認められた。ucOC投与によるインスリン濃度の上昇は、GLP-1受容体のアンタゴニストexendin(9-39)の前投与で抑制された。以上の結果から、ucOCによるインスリン分泌作用は、膵臓への直接作用に加えてGLP-1を介したものであることが明らかになった。

**O-79**

FGF23/klotho軸の破綻は血管骨化を誘導する—klotho遺伝子変異マウスを用いた組織学的検索—  
 ○長谷川 智香<sup>1</sup>、山田 珠希<sup>1</sup>、佐々木 宗輝<sup>1</sup>、笹野 泰之<sup>2</sup>、網塚 憲生<sup>1</sup> (北大 院歯 硬組織発生生物、<sup>2</sup>東北大 院歯 顎口腔形態創建)

メンケベルグ型動脈硬化は病態の進行に伴い動脈中膜に石灰化を生じる。そこで、我々は、中膜石灰化のモデル動物であるklotho遺伝子変異(kl/kl)マウスの大動脈を組織化学的に検索した。生後7週齢kl/klマウスでは、野生型マウスと比較して大動脈中膜に著しい石灰化を認めた。石灰化領域の血管平滑筋細胞はTNAP/ENPP1陽性を示す骨芽細胞様細胞へと変化しており、その周囲には多数のI型コラーゲン線維および基質小胞を認めた。石灰化が進行した領域では、オステオポンチン、オステオカルシン、基質グラ蛋白陽性を示す石灰化基質が形成されており、基質内部にはFGF23陽性骨細胞様細胞が、また、基質表層にはTRAP陽性破骨細胞様細胞が出現した。TEM-EDX法で元素分析を行うと、これらの石灰化基質は結晶構造を有するリン酸カルシウムであることが示された。現在の考え方では、血管石灰化は血中Pi濃度上昇に起因するとされているが、FGF23/klotho軸の主役であるaklothoを欠損したマウスではPi濃度が上昇しても著しい血管石灰化を示さない。従って、我々は全身的なFGF23/klotho軸の破綻以外に原因があると考え、現在、DNA arrayなどを用いた解析を進めている。以上、kl/klマウスでは、血管平滑筋細胞が骨芽細胞様細胞へ変化することにより血管石灰化および血管骨化を誘導する可能性が示唆された。



## O-80

発生の骨格組織分化における H3K9 メチル化酵素群の発現局在

○二藤 彰<sup>1</sup>、島田 明美<sup>1</sup>、中島 和久<sup>1</sup> (鶴見大 歯 薬理)

ヒストン末端の翻訳後修飾が、他のタンパクとの相互作用を介しクロマチンの構造に影響を与え、結果として遺伝子発現を制御することが知られている。我々は、ヒストン H3 リジン K9 を修飾するメチル化酵素に焦点をあて硬組織の分化機構分化における機能を明らかにしたいと考えている。その目的で骨格形成過程における H3K9 メチル化酵素の発現局在を詳細に調べた。免疫組織化学によって H3K9 methyltransferases 群の G9a, G9b, Setdb1, PRDM2, SUV39H1, SUV39H2 どれもが E12.5 において、骨原基での局在がほとんど見られなかった。E14.5 には前肥大軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層にそれらのすべての発現局在が認められた。また mono-, di-, tri-メチル化したヒストン H3 リジン K9 残基の局在も同部位に強く認められた。E16.5 においては、肥大軟骨細胞層に加え骨芽細胞にも局在が認められた。これらの局在は スライスした組織から直接抽出した RNA を用いた real time PCR、ならびにウェスタンブロットによっても確認できた。さらに軟骨の初代培養においてもこれらを確認した。以上の結果から、ヒストン H3 リジン K9 メチル化酵素を介したヒストンリジン残基のメチル化が、骨格組織の軟骨分化過程に関わる可能性が強く示唆された。

## O-82

SP6 positively regulates Rock1 promoter activity in dental epithelial cells

○Yanuaryska Ryna Dwi<sup>1</sup>、三好 圭子<sup>2</sup>、堀口 大吾<sup>2</sup>、谷村 綾子<sup>2</sup>、Arya Adinigrat<sup>1</sup>、野間 隆文<sup>2</sup> (徳大 口腔科学教育 口腔科学、<sup>2</sup>徳大 院 HBS 分子医化)

【Objectives】 *Sp6*, a transcription factor of the SP/KLF family, plays the important roles in tooth development. We identified *Rock1*, a serine threonine kinase, as one of SP6 target genes. However, the regulation of *Rock1* expression by SP6 remains unclear. 【Materials and Methods】 Potential SP6 binding sites were screened in 2.5 kb *Rock1* promoter by *in silico* analysis. ChIP-PCR was performed in SP6-high producer cells, C9. Luciferase reporter constructs were generated and their promoter activity were analyzed with cotransfection of either *Sp1* or *Sp6*. 【Results and Discussions】 We confirmed that SP6 can bind to *Rock1* promoter region -1006 to -471, we named A region. Transient SP6 overexpression elevated the promoter activity of A region. Deletion of region -206 to -150 resulted in a loss of enhancing activity by SP6. Interestingly, cotransfection of *Sp1*, another Sp-family member, showed the reduction of *Rock1* promoter activity. These results suggested that SP6 positively regulates *Rock1* promoter activity and functionally different from SP1. The underlying mechanisms are under investigation.

## O-81

ラット頭蓋骨発生・成長過程における骨基質石灰化の成熟に関する検討

○逸見 晶子<sup>1</sup>、大方 広志<sup>2</sup>、三上 靖人<sup>1</sup>、鈴木 治<sup>3</sup>、笹野 泰之<sup>1</sup> (東北大 院歯 顎口腔形態創建、<sup>2</sup>東北大 院歯 歯内歯周治療、<sup>3</sup>東北大 院歯 顎口腔機能創建)

【目的】 骨発生における石灰化の成熟については知見が乏しい。本研究では、発生・成長期のラット頭蓋骨を構成する元素の分布と相対的濃度及び結晶構造の解析を行い、骨基質の石灰化を検討することを目的とした。【方法】 胎生 16、18、20 日齢、生後 1、6 週齢のラットを固定し、頭部を試料とした。その後、試料を非脱灰で凍結包埋して頭蓋骨前部まで前頭方向に切片を作製し、組織学的に検討した。切片を得た凍結包埋試料を凍結乾燥し、断面を対象に分析走査電子顕微鏡(SEM-EDX)を用いて構成元素(Ca, P, C)の分布と相対的な濃度を解析した。さらに、X 線回折(XRD)により、各発生・成長段階のラット頭蓋骨基質の石灰化物の結晶構造を解析した。【結果】 組織切片上で、胎生 16 日に頭蓋骨の形成が認められた。SEM-EDX による分析では、骨組織に一致して Ca と P の集積が見られ、その他の部位に C の集積が見られた。骨基質における元素濃度比 Ca/P は胎生 16 日で低く、発生・成長に伴い上昇する傾向が見られた。また、C/Ca、C/P は胎生 16 日で高く、胎生 18 日以降は低下した。さらに、XRD による解析では、胎生 16 日以降生後 6 週に至る過程で骨基質の石灰化物の結晶構造が成熟することが示された。【結論】 ラット頭蓋骨は発生・成長過程で、有機質の相対的な減少を伴いながら石灰化が進行し、非晶質リン酸カルシウムから低結晶性のアパタイトに成熟する。

## O-83

CXCL3 は脂肪細胞分化を正に制御する

○楠山 譲二<sup>1,2</sup>、坂東 健二郎<sup>1</sup>、柿元 協子<sup>1</sup>、大西 智和<sup>1</sup>、松口 徹也<sup>1</sup> (鹿大 院医歯 口腔生 化、<sup>2</sup>日本学術振興会)

脂肪細胞はアディポカインと総称される生理活性物質を分泌することで、代謝や病態形成に関与することが知られている。脂肪細胞の産生するケモカインとしては CCL2 (MCP-1) が報告されているが、その他のケモカインの分泌や役割についてはよく分かっていない。我々は脂肪細胞分化に伴う種々のケモカインの発現を調べ、新規アディポカインとしての機能を検討した。マウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 細胞を分化誘導し、ケモカイン群の発現レベルを網羅的に解析したところ、CXCL3 (MIP-2β)、CXCL13 (BLC)、CCL24 (MPIF-2) の mRNA 発現レベルが著明に上昇した。またケモカイン受容体群については、CXCL3 受容体である CXCR2 の発現が高くなった。リコンビナント CXCL3 を培地に添加しながら、3T3-L1 細胞を分化させると、脂肪滴の形成や脂肪分化マーカー遺伝子の発現が促進した。一方、CXCL3 と同様に CXCR2 リガンドである CXCL2、CXCL13 を加えた場合は、脂肪細胞の分化に影響を与えなかった。さらに CXCL3 および CXCR2 の siRNA によるノックダウンを行うと、脂肪細胞分化は抑制された。3T3-L1 細胞への CXCL3 投与によって活性化されるシグナル分子を検討したところ、ERK、JNK がリン酸化され、その標的遺伝子として C/EBPδ を同定した。このように脂肪細胞によって産生される CXCL3 は、オートクライン/パラクラインの作用によって、分化を促進する新規アディポカインであることが示唆された。

**O-84**

マウス舌形態形成におけるリンパ管発生と分子制御

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

【目的】マウス胎仔の初期リンパ管発生はE9.5以降で体幹部の主静脈内皮細胞からリンパ管内皮細胞への分化と遊走として観察される。顎顔面領域での血管・リンパ管・神経のネットワーク構築についての予備検討では、我々はE12.5以降にリンパ管内皮細胞の表現型を観察してきた。本研究では、顎顔面領域で最も早期にリンパ管発生を生じる舌組織を対象として、リンパ管の分化誘導因子の発現と発生機序について検討した。【方法】ICR マウス胎仔 (E9.5~14.5) の下顎突起正中部・舌組織でのリンパ管発生に関わる遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイ・IPA解析で調べるとともに、リンパ管内皮マーカー (Lyve1/VEGFR3) と分化誘導因子 (Prox1/CoupledTF2/VEGFC) の特異抗体の多重免疫染色によりリンパ管発生を形態学的に検討した。【結果と考察】胎仔舌領域では、リンパ管発生誘導に働く遺伝子発現はE9.5から検出されたが、*CoupledTF2* と *Prox1* はE11.5以降に発現上昇し、*Lyve1* はE14.5で高発現を示した。舌領域の組織観察では、E9.5~11.5においてリンパ管発生は観察されず、E12.5からProx1(+)/CoupledTF2(+)/Lyve1(+)<sup>+</sup>陽性細胞が出現し、E14.5前後では舌基部の静脈内皮細胞においてリンパ管内皮への分化傾向と出芽・遊走・管腔形成を認めた。以上の結果から、舌リンパ管の発生は主静脈から遊走したリンパ管内皮細胞とは別個に、舌組織独自にリンパ管内皮細胞の分化とリンパ管形成を遂げることが示唆された。

**O-86**

糖尿病環境下の糸球体内皮細胞におけるTLR2とTLR4の発現

○高田 俊輔<sup>1</sup>、内山 貴誠<sup>1</sup>、敦賀 英知<sup>2</sup>、畠山 雄次<sup>2</sup>、石川 博之<sup>1</sup>、沢 禎彦<sup>2</sup> (1福歯大 成長発達歯、2福歯大 生体構造)

糖尿病性腎症ではメサンギウム基質の増生と糸球体毛細血管壁の肥厚が認められ、高分子蛋白の高血糖による非酵素的な糖修飾と酸化によって形成される終末糖化産物とその原因物質とされる。終末糖化産物には免疫原性があり、血管内皮細胞は受容体で認識して白血球接着因子の発現を増強する。またメサンギウム細胞に細胞外基質の増生による糸球体硬化を亢進させる。当研究室は最近、streptozotocin誘発性の膝ランゲルハンス島破壊型1型糖尿病マウスとKK/Ta-Jclマウスを高カロリー餌で飼育した2型糖尿病マウスについて免疫分子発現の組織化学的検索を行った結果、高血糖環境にある腎糸球体では、PECAM-1とVE-cadherin陽性の糸球体毛細血管内皮細胞が、健康マウスでは発現の見られないtoll-like receptor (TLR)2と4を発現すること、糸球体外の血管や、糸球体上皮とメサンギウムでは発現が見られないことを見出した。これらの発現は腎皮質全体にわたって見られ、さらにTLR2の発現はTLR4とは異なり、糸球体血管のみならず遠位尿管上皮の管腔側にも見られた。糸球体では終末糖化産物蓄積など長期的酸化ストレス環境下で毛細血管にTLRの発現が起こり、体循環系に侵入した微生物成分がTLRを介して糸球体毛細血管内皮細胞に認識されることで、糸球体硬化による糖尿病性腎症が促進するかもしれない。

**O-85**

ケモカインCXCL14/BRAKは多段階癌抑制分子である

○畑 隆一郎<sup>1</sup>、居作 和人<sup>2</sup>、加藤 靖正<sup>3</sup> (1神歯大 院口腔難治、2神歯大 院歯 口腔科学、3奥羽大 歯 口腔機能 分子生物)

【目的】我々は先にBRAKが種々の移植癌の増殖と転移を抑制することを示した。癌は多段階の過程で進展することが知られている。今回はBRAKがI.発癌段階を抑制するかどうか、およびII.癌細胞を尾静脈より注入した(実験的肺転移)マウスの寿命を延ばすかどうかについて調べた。【方法】I. BRAKを過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスと野生型(Wt)マウスにアゾキシメタンと3%のデキストラン硫酸ナトリウムを用いて実験的大腸癌を発生させた。II. TgマウスとWtマウスの尾静脈より3千-20万の悪性黒色腫細胞を注入し、肺への転移とマウスの生存率を調べた。【結果】アゾキシメタン注射56日後のマウスではBRAK Tgマウスの大腸癌の数はWtマウスの1/10であり有意に少なかった。また、黒色腫細胞を注入したすべての細胞数においてBRAK Tgマウスの方がWtマウスより肺への転移数が有意に少なく、かつ、注入腫瘍細胞数が減少するほど両者の生存率の差は大きくなり、注入細胞数3千ではWtマウスの生存率が50%に対してTgマウスでは100%であった。【結論】ケモカインCXCL14/BRAKは正常細胞で大量に合成されており、健康人のなかにTgマウスレベルのBRAKを発現している個体が存在するので、CXCL14/BRAKは副作用のない新しい癌の治療法開発のための有望な分子標的と考えられる。本研究は金沢大学癌進展制御研究所佐々木博士、向田博士との共同研究である。

**O-87**

*Candida albicans*による歯肉癌上皮細胞Ca9-22のgalectin-3放出増加

○玉井 利代子<sup>1</sup>、清浦 有祐<sup>1</sup> (1奥羽大 歯 口腔病態解析制御)

【目的】Galectin-3は上皮細胞等に存在するC型レクチンレセプターの一つである。本研究では、歯肉癌上皮細胞Ca9-22のgalectin-3放出を検討した。【方法】Ca9-22細胞を*C. albicans* OH-1(生菌MOI 1、加熱死菌MOI 100)と無血清MEM培地で共培養後、上清を回収、galectin-3放出をELISA法で定量した。抑制実験では、PI3Kまたはcalpain抑制剤(10 μM または50 μM)を使用した。同細胞のgalectin-3発現はフローサイトメトリーまたはWestern blotting法で調べた。NF-κBの活性化はELISA法で検討した。【結果と考察】1) Ca9-22細胞は膜上にgalectin-3を発現していた。2) *C. albicans* 無添加でもgalectin-3の放出は経時的に起きるが、*C. albicans*を加えた方が、生菌死菌に関わらず、より多くのgalectin-3が放出された。3) *C. albicans*によるCa9-22細胞のNF-κB活性化は無血清下ではみられなかった。Galectin-3は*C. albicans*の細胞壁に含まれる糖に結合して殺菌へ導くが、LPSにも結合するので、グラム陰性菌の上皮細胞への侵入に関与する可能性が考えられる。

**O-88**

米由来 CL ペプチドの内毒素活性に対する抑制効果

○加藤 哲男<sup>1</sup>、国分 栄仁<sup>2</sup>、谷口 正之<sup>3</sup>、齋藤 淳<sup>4</sup>、齋藤 英一<sup>5</sup>、石原 和幸<sup>2</sup> (東歯大 化学、<sup>2</sup>東歯大 微生物、<sup>3</sup>新大院 自然、<sup>4</sup>東歯大 歯周病、<sup>5</sup>新潟工大 環境)

【目的】我々は、米由来のペプチドの抗菌作用を検討し、米 cyanate lyase (CL) 由来の 12 残基からなるペプチドが *Porphyromonas gingivalis* などに抗菌活性を示すことを明らかにしている。本研究では、代表的な病原因子である内毒素 (LPS) をターゲットにして、米由来 CL (14-25) ペプチドの内毒素抑制作用についてヒト培養細胞あるいはマウスを用いて検討した。

【方法】内毒素として *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 LPS、*Escherichia coli* O55 LPS、*E. coli* J5 LPS、*E. coli* R515 由来の lipid A を用いた。培養液に LPS (lipid A) (100 ng/ml) とともに CL (0.035 mM~0.14 mM) を加え、ヒト正常大動脈内皮細胞 (HAEC) を培養し、17 時間後の培養上清中の IL-6 量を ELISA キットで測定した。また、LPS のマウス致死性に対する CL ペプチドの阻害効果について BALB/c マウスを用いて検討した。BALB/c マウスに *E. coli* O55 LPS 0.5 mg/mouse および CL ペプチド 1、0.5、0.1 mg/mouse を腹腔投与し、その後の致死率を調べた。【結果と考察】CL ペプチドは、共試したすべての LPS および lipid A の IL-6 産生誘導能に対して濃度依存的に抑制効果を示した。また LPS のマウス致死性に対する抑制効果を調べた結果、CL ペプチドは抑制効果を示し、内毒素活性抑制物質としての有用性が示唆された。CL ペプチドは、lipid A に結合し抗内毒素効果を発揮するものと思われる。(共同研究者：高山沙織 (東歯大 歯周病))

**O-90**

ヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清を用いた難治性肝疾患治療法の開発

○松下 嘉泰<sup>1</sup>、山本 朗仁<sup>1</sup>、松原 弘記<sup>1</sup>、上田 実<sup>1</sup> (名大院医 頭頸部・感覚器外科 顎顔面外科)

劇症肝炎は短期間で高頻度に死に至る原因不明の難治性疾患である。有効な治療法としては臓器移植が挙げられるが、ドナー不足等の問題があり、罹患者全てが受けられないのが現状である。近年、ラット劇症肝炎モデルに静脈内投与した骨髄間葉系幹細胞 (BMSC) の治療有用性が報告された。BMSC が分泌する免疫制御因子による効果が大きいと考えられるが、移植後に「幹細胞の分泌活性」や「細胞運命・腫瘍化」などを制御することは不可能であり、幹細胞由来分泌因子の実用化に向けた新たな戦略が求められている。今回、我々は「ヒト歯髄幹細胞由来の無血清培養上清 (SHED-CM)」を劇症肝炎モデルラットへ静脈内投与し、著明な生存率の向上、及び病態改善を確認した。BMSC-CM や脂肪幹細胞 (ADSC)-CM を投与しても生存率の向上、及び病態改善は得られなかった。詳細な解析で SHED-CM は、患部へ集積した活性化マクロファージを抗炎症系へと転化させ、組織破壊的環境を肝臓再生・修復環境に導くこと、肝臓細胞のアポトーシス抑制および肝幹細胞増殖促進効果によって肝再生を促進することを見いだした。歯髄幹細胞培養上清の劇症肝炎モデルラットへの静脈内投与は、細胞移植を必要としない臨床的に応用しうる有用な治療手段となると考えられた。

**O-89**

MAP キナーゼフォスファターゼ (DUSP) mRNA の不安定性による細胞ストレス反応の調節機構

○松口 徹也<sup>1</sup>、楠山 譲二<sup>1</sup>、坂東 健二郎<sup>1</sup>、柿元 協子<sup>1</sup>、大西 智和<sup>1</sup> (鹿大院医歯 口腔生化学)

【目的】細胞内シグナルに関わる MAP キナーゼは、上流キナーゼによる TXY モチーフの同時リン酸化によって活性化され、同モチーフの脱リン酸化に関わるフォスファターゼファミリー (DUSPs: dual specificity phosphatases) の働きによって不活性化される。我々が以前報告した DUSP16 (aka MKP-M. MKP-7) は JNK を特異的に不活化する。今回 UV 等の細胞ストレス刺激に対する各種 DUSP の mRNA レベルの変化を検討した。

【方法】マウス表皮角化細胞由来 Pam212 株および骨芽細胞株 MC3T3-E1 に、UV (10~250 J/m<sup>2</sup>)、VP16、anisomycin を加えた後に、定量 RT-PCR 法にて、各種 DUSP の遺伝子発現レベルを解析した。また、マウス DUSP16 欠失型 cDNA を含む発現プラスミドを Pam212、MC3T3-E1 の両細胞株に導入し、UV 照射に対する外来型 DUSP16 mRNA レベルの変化を解析した。【結果と考察】Pam212、MC3T3-E1 両細胞株において UV 照射 2 時間以内に複数の DUSP (3,4,5,6,7,8,10,14,16) の mRNA レベルは 60% 以下に低下した。特に DUSP8 と 16 の mRNA レベルは UV 照射 30 分以内に 30% 程度にまで著明に低下した。さらに、欠失型 cDNA を用いた解析より、DUSP16 mRNA の高速な分解を誘導する調節 mRNA 領域を同定した。DUSP mRNA の高速な分解が UV 等の細胞ストレスによる MAP キナーゼ活性調節に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

**O-91**

歯周病細菌感染マクロファージにおけるインフラマソーム活性

○沖永 敏則<sup>1</sup>、有吉 渉<sup>1</sup>、西原 達次<sup>1</sup> (九歯大 感染分子)

【目的】我々は、歯周病細菌感染マクロファージにおいて、細胞周期停止の誘導を分子生物学的解析により明らかにしてきた。今回、歯周病細菌感染マクロファージにおける炎症反応誘導時に、インフラマソームが活性化することを見出した。【方法】マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 と歯周病細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 株を使用し、我々が確立した感染実験を行った。siRNA 導入により、ノックダウン細胞を作成した。タンパク発現はウェスタンブロットティング、遺伝子発現はリアルタイム RT-PCR で、サイトカイン産生は ELISA 法で解析した。フローサイトメーターを用いて、活性酸素ならびにファゴサイトーシス活性を測定した。【結果と考察】感染実験後の RAW264.7 細胞が、ファゴサイトーシスにより歯周病細菌を取り込んでいることを確認した。インフラマソーム関連因子である NLRP3 受容体の発現と IL-1 $\beta$  の発現、ならびにアダプタータンパク質 ASC や caspase-1 の発現を確認した。NLRP3 ノックアウト細胞において、IL-1 $\beta$  の発現抑制を確認した。また、歯周病細菌感染によるカテプシン B や活性酸素の発現が認められ、これらの発現阻害剤により IL-1 $\beta$  発現が抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、歯周病細菌感染マクロファージにおいて、NLRP3 の発現を伴うインフラマソーム活性化が誘導され、その誘導には、カテプシン B や活性酸素が関与していることが明らかとなった。

**O-92**

レニンにより誘導されるNK細胞の免疫応答  
 ○鳥田 栄理遣<sup>1</sup>、遠藤 実里<sup>1</sup>、小笠原 康悦<sup>1</sup> (東北大 院歯 難治・口腔免疫)

【目的】糖尿病などの生活習慣病は、日本国内において2210万人にのぼるとされ、歯科治療においても生活習慣病への理解は重要である。糖尿病は合併症が重篤であり、糖尿病性腎症は腎疾患の中で最も多いとされている。糖尿病性腎症などの腎疾患においては、レニン-アンギオテンシン系が関与することが報告されており、レニン-アンギオテンシン系の作用としては、炎症反応の調節、血管収縮や拡張、血圧の調節などがある。しかしながら、レニン-アンギオテンシン系と免疫系との関与については良くわかっていない。今回我々は、生体防御の最前線で働いているNK細胞に着目し、NK細胞へのレニンの働きについて調べることを目的に研究を行った。【方法】マウスNK細胞を脾臓より単離し、IL-2にて培養したのち、レニンを培養液に加え、NK細胞の活性化について、フローサイトメトリーを用いて検討した。【結果と考察】マウス脾臓から単離したNK細胞は、95%以上の純度で培養することができた。IL-2で培養したNK細胞にレニンを加え刺激した場合、NK細胞のIFN- $\gamma$ 産生が増強した。このことから、レニンはNK細胞の活性化にかかわっていることが判明し、腎症などの炎症においてもNK細胞がかかわっている可能性が考えられた。

**O-93**

NK細胞の誘導性細胞死機構の発見  
 ○小笠原 康悦<sup>1</sup>、鳥田 栄理遣<sup>1</sup>、遠藤 実里<sup>1</sup> (東北大 院歯 難治・口腔免疫)

【目的】NK細胞は生体防御の最前線で働く免疫細胞であり、ウイルス感染細胞、腫瘍細胞の排除にかかわっている。その際、NK細胞は増殖、活性化して感染細胞を排除する。しかしその一方で、増殖し活性化したNK細胞は、どのようにして減少し、炎症が終息するかについての分子機構は不明である。特に、がん免疫療法において効果があがらない症例においては、急速なNK細胞死が観察されており、その原因究明が待ち望まれていた。そこで我々は、活性化NK細胞の細胞死の解明を目的とし研究を行った。【方法】マウスNK細胞を、腫瘍細胞と共培養後NK細胞の細胞表面をフローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡により解析した。また、腫瘍局所のNK細胞の状態を観察した。【結果と考察】活性化NK細胞は、腫瘍細胞から膜分子を奪うことを発見した。この現象は、我々が発見したドレス細胞と呼ばれる細胞に変化する機構と同じ現象であった。ドレス細胞とは、我々が命名した細胞集団であり、NK細胞が樹状細胞上の分子を奪い取って変化した細胞である。腫瘍局所で、活性化NK細胞がドレス細胞に変化することで、ドレス細胞が腫瘍と同じ膜分子をもつことになり、新たなNK細胞の標的となって排除されてしまうことを発見した。この結果は、増殖したNK細胞の細胞死の新たな分子機構と考えられた。

**O-94**

金属アレルギーにおける金属イオン可視化技術の開発  
 ○遠藤 実里<sup>1</sup>、鳥田 栄理遣<sup>1</sup>、小笠原 康悦<sup>1</sup> (東北大 院歯 難治・口腔免疫)

【目的】金属アレルギーは、歯科領域では無視できない重要な疾患である。我々は厚生労働省研究班を組織し全国調査をおこなったところ、接触皮膚炎で来院した患者において、ニッケル、コバルト、クロムがアレルギーの3大原因金属であること、パッチテスト陽性率は近年増加傾向にあることを明らかにした。金属アレルギーの発症機序としては、1. 汗や唾液などによってイオン化した金属が体内に取り込まれる。2. 金属イオンが体内のタンパク質と結合し異物と認識されることにより抗原性を持つ。3. その抗原に対して病原性T細胞が活性化しアレルギーが発症する。とされているが、その詳細は未だ不明のままである。金属イオンの体内動態を明らかにすることができれば、金属アレルギーの発症機序を詳細に解明することが可能となる。その第一歩として、金属イオンの可視化が必須と考えられるため、今回、我々は金属イオンの可視化を目的に研究を行った。【方法】マウスマクロファージ系細胞を培養し、金属イオンを培養液中に添加した。その培養中に蛍光発光試薬を加え特殊処理を施すことにより、金属イオンをフローサイトメトリー、および蛍光顕微鏡で観察した。【結果と考察】金属イオンは特殊処理を施すことで蛍光発光試薬と結合することが判明し、金属イオンの可視化に成功した。金属イオンの可視化により、金属イオンの体内動態の解析も可能となったと考えられる。

**O-95**

イグサ抽出液によるう蝕および歯周病予防効果の検討  
 ○村上 圭史<sup>1</sup>、星野 由美<sup>2</sup>、弘田 克彦<sup>1</sup>、三宅 洋一郎<sup>1</sup> (徳大 院HBS 口腔微生物、<sup>2</sup>徳大 院HBS 口腔保健衛生)

【目的】イグサは古来より畳の原料として用いられているだけでなく、古くから民間療法として、消炎薬、鎮静薬等としても用いられてきた。本研究では、イグサ抽出液の、う蝕および歯周病予防への応用の可能性について検討した。【方法】イグサ粉末(イナダ有限会社)を水で加温抽出し、イグサ抽出液を作製した。微量液体希釈法により、口腔細菌に対する最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。次に、*S. mutans*の唾液処理ヒドロキシアパタイト(HA)板への付着作用について検討した。さらに、歯肉上皮細胞に対する抗炎症効果を検討するため、イグサ抽出液で処理した歯肉上皮細胞に、*P. gingivalis* LPSを添加し、培養上清中のIL-8およびCCL20の濃度をELISAにより定量した。【結果および考察】イグサ抽出液の口腔細菌に対するMICは、*S. mutans*で12.5 mg/ml、*P. gingivalis*では1.6 ~ 3.1 mg/mlであった。*S. mutans*の唾液処理HA板への付着率を測定したところ、有意な減少が認められた。また、イグサ抽出液の処理により、LPSで刺激した歯肉上皮細胞からのIL-8、CCL-20の産生は有意に抑制されていた。以上の結果から、イグサ抽出液は、う蝕、歯周病予防として、歯科应用到に有効である可能性が示された。(会員外研究協力者：湯本浩通)

**O-96**

ヒト歯肉由来上皮細胞における分化および老化の転写機構

○Bhawal Ujjal<sup>1</sup>、小林 良喜<sup>2</sup>、福岡 シンティア由希<sup>1</sup>、安孫子 宜光<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>日大 松戸歯 生化・分子生物、<sup>2</sup>日大 松戸歯 口腔免疫)

Human epithelial cells undergo morphological and molecular changes leading to terminal differentiation and replicative senescence during serial subculture. However, the target genes and their functional significance in the differentiation and senescence in normal human oral keratinocytes (NHOKs) have been poorly defined. Here, we demonstrated NHOKs transcriptional signature profiling to differentiation and senescence in vitro. Using microarray analysis, our findings indicated that the gene expression profiles induced by serial subculture are distinct classes of gene. The greatest number of these altered genes was identified as being related to biologic pathways of transport, cell proliferation, cell cycle, defense and immune response, cell death, transcription, apoptosis, and inflammatory response, suggesting that the serial subculture is able to induce a multitude of specific gene expression changes during differentiation and senescence. These results suggest that activation of several genes induces the differentiation and senescence of epithelial cells, and suggest a new approach to determine the biological events underlying the pathogenesis of oral keratinocyte aging.

**O-98**

マウス咬筋活動に対する睡眠-覚醒の影響

○片山 慶祐<sup>1,2</sup>、望月 文子<sup>1</sup>、加藤 隆史<sup>3</sup>、池田 美菜子<sup>2</sup>、野川 泰葉<sup>1,2,4</sup>、中村 史朗<sup>1</sup>、中山 希世美<sup>1</sup>、矢澤 格<sup>1</sup>、馬場 一美<sup>2</sup>、井上 富雄<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>昭大 歯 口腔生理、<sup>2</sup>昭大 歯 歯科補綴、<sup>3</sup>阪大院歯 解剖 2、<sup>4</sup>東医歯大 歯 部分床義歯補綴)

咬筋は嚥下や顎反射、咀嚼運動などの顎運動機能にとって重要な役割を担っている。これまで、覚醒時の咬筋活動については様々な報告がなされているが、睡眠中の咬筋活動の詳細は不明である。そこで我々は、マウスの咬筋の筋活動を24時間計測し、覚醒時と睡眠時で筋活動にどのような変化があるのかを検討した。実験はC57BL/6マウス(10~12週齢)を用い、12時間の明暗サイクル(点灯[明期]:午前8時~午後8時、消灯[暗期]:午後8時~午前8時)の環境下で、脳波、眼電図、筋電図(頸筋と咬筋)を24時間記録し、覚醒時、睡眠時(ノンレム睡眠、レム睡眠)でのそれぞれの時間と咬筋活動量を4時間毎の合計値として解析した。過去の報告と同様に、暗期の覚醒時の時間は、明期と比較して有意に長く、暗期のノンレム睡眠・レム睡眠時の時間は、明期と比較して短かった。覚醒時の咬筋活動量は、明期や暗期に関わらず、ほぼ一定の値を維持していた。ところが、ノンレム睡眠およびレム睡眠時の咬筋活動量は、覚醒時と比較して有意に減少した。一方、ノンレム睡眠及びレム睡眠時においても、咬筋活動量は、明期と暗期で有意の差が認められなかった。以上の結果から、マウスの咬筋活動量は、サーカディアンリズムの制御機構よりむしろ、睡眠-覚醒の制御機構の影響を受けることが示唆された。

**O-97**

Nicotine 誘導性 CCN2/CTGF がヒト歯周組織由来培養細胞の線維化に与える影響

○五十嵐 寛子<sup>1,4</sup>、久保田 聡<sup>2</sup>、立花 利公<sup>3</sup>、村樫 悦子<sup>1</sup>、岡部 正隆<sup>4</sup>、滝川 正春<sup>2</sup>、沼部 幸博<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>日歯大 歯周病、<sup>2</sup>岡大院歯歯薬 口腔生化学、<sup>3</sup>慈恵大 共用施設、<sup>4</sup>慈恵大 解剖)

喫煙者の歯肉に肥厚が見られるが、これらの関係を示した報告は少ない。そこで、線維化因子である結合組織成長因子(CCN2/CTGF)に着目し、ヒト歯肉線維芽細胞と歯根膜由来線維芽細胞における TGF- $\beta$ 1 と CCN2/CTGF との関係、nicotine の CCN2/CTGF 産生に与える影響、I 型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1 そして TGF- $\beta$ 1 に対する nicotine の影響、さらに、nicotine 影響下における CCN2/CTGF と I 型コラーゲンとの関係について探索した。

その結果、両細胞において TGF- $\beta$ 1 刺激により CCN2/CTGF の増加が認められ、両者に正の相関が示唆された(Takeuchi et al, J Periodontal Res. 2009)。また Nicotine 刺激により細胞数の減少および細胞に空胞変性が認められる一方、CCN2/CTGF の増加が認められた。興味深いことに Type I collagen にも増加が認められ、それは CCN2/CTGF 中和抗体によって打ち消された(Takeuchi et al. J Dental Res.2010)。さらに nicotine 刺激によって MMP-1 の分泌は起こらず、TIMP-1 および TGF- $\beta$ 1 の増加が認められた。

以上から、nicotine の刺激により増加した CCN2/CTGF により I 型コラーゲンが誘導され、nicotine により I 型コラーゲンの恒常性の調節因子である MMP-1、TIMP-1 にアンバランスが生じることにより I 型コラーゲンが蓄積するという、歯周組織線維化の分子機構が明らかとなった。

**O-99**

咬合高径の変化が噛みしめ運動の調節機構に及ぼす影響

○藤浪 陽三<sup>1</sup>、田中 佑人<sup>1</sup>、姜 英男<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>阪大院歯 口腔生理)

下顎安静位付近における噛みしめ運動時、ある咬合力を發揮しようとする場合、意図した筋活動が期待した咬合力を發揮したかを検証するため、意図した度合いの筋張力の情報を、実際に發揮された咬合力により引き起こされる歯根膜圧情報に対して比較校正する仕組みが存在する可能性が明らかにされた(Tsukiboshi et al J Neurophysiol 2012)。しかし、それが下顎安静位付近でのみ機能するのか、或は、咬合高径の如何に関わらず機能するのかは明らかでない。今回我々は、この校正機構が至適の下顎位でのみ成立するかについて検討した。被験者に、開口方向への単調増加負荷に対し最小限の力で抵抗し下顎位を維持するよう指示し、その時、發揮される咬筋筋活動(RMS)及び咬合圧を記録した。その結果、咬合挙上条件時、閉口筋が負荷に対して必要以上に速く、強い応答を示した。また、咬合挙上条件時及び低下条件時、過剰咬合圧が發揮されることが示された。以上のことから、歯根膜圧受容器と閉口筋筋紡錘の間に存在する校正機構は至適の下顎位においてのみ正確に機能することが示唆された。こうした校正機構により、咬合高径を機能的に決定することが可能であると考えられる。

**O-100**

自然睡眠における顎運動リズム発生機構の実験的賦活

○加藤 隆史<sup>1</sup>、山田 謙<sup>2</sup>、東山 亮<sup>3</sup>、Akhter Fatema<sup>1</sup>、Haque Tahsinul<sup>1</sup>、古郷 幹彦<sup>2</sup>、吉田 篤<sup>1</sup> (¹阪大 院歯 口腔解剖 2、²阪大 歯 口腔外科一、³阪大 歯 歯科補綴一)

【目的】ヒトのノンレム睡眠ではしばしばリズム性顎運動が発生する。しかし、実験動物の自然睡眠において、実験的に顎運動リズム発生機構を駆動しうるかどうかが未だ不明である。本研究では、自然睡眠において、皮質下行路を連続電気刺激して顎運動リズムを誘発することを試み、その応答特性を調べた。【方法】雄性モルモットを用い、全身麻酔下にて脳波・眼電図・筋電図(両側咬筋・顎二腹筋・頸筋)・心電図の電極を装着した。手術約二週間後、全身麻酔下で皮質下行路に刺激電極を刺入し留置した。その後、自由行動下において、連続電気刺激(持続時間2秒、頻度:30 Hz、強度50-100 uA)を与え、リズム性顎運動の発生の有無を調べた。【結果と考察】皮質下行路への連続電気刺激によって、覚醒およびノンレム睡眠でリズム性顎運動を誘発できた。いずれの条件においても、リズム性顎運動の誘発率は刺激強度の上昇とともに増加したが、ノンレム睡眠では覚醒より有意に低かった(p<0.05)。また、誘発したリズム性顎運動は、一時的な睡眠深度の浅化と関係していた。したがって、ノンレム睡眠では、顎運動リズム発生機構の興奮性は覚醒よりも低い、皮質下行路の電気刺激によって駆動できることが示された。

**O-101**

ミクログリアにおけるカテプシンSの発現リズムによるシナプス強度の調節

○林 良憲<sup>1</sup>、岡田 亮<sup>1</sup>、武 洲<sup>1</sup>、中西 博<sup>1</sup> (¹九大 院歯 口腔機能分子科学)

【目的】リソソーム酵素であるカテプシンS(CatS)は末梢では、抗原提示に深く関与する事が数多く報告されている。CatSは中枢神経系ではミクログリアに特異的に発現しているのだが、中枢におけるCatSの役割は未だ明らかではない。そこで本研究では中枢におけるCatSの役割を解明すると共に、ミクログリアの役割を解析した。【方法・結果】ミクログリアは時計遺伝子を有しておりCatSの発現リズムを調節している事が明らかとなった。CatS欠損マウスでは自発運動量の亢進あるいは睡眠レベルの減少が認められた。更に昼夜のシナプス強度変化あるいはスパインの密度変化はCatS欠損マウスにおいて消失していた。また、ミクログリアより分泌されるCatSがミクログリアの突起進展、更にはシナプス周囲の分解調節によりシナプス強度を制御する事が明らかとなった。【結論】以上の結果より、ミクログリアのカテプシンSがシナプス機能の調節に深く関与しており、複雑な脳機能の解明の一端を担うものである。(非会員共同研究者:小柳悟、楠瀬直樹、齊藤秀俊、井上和秀、大戸茂弘)

**O-102**

クロモグラニンA(CGA)によるミクログリアにおけるカテプシンBに依存した新規IL-1β産生経路の解明

○武 洲<sup>1</sup>、中西 博<sup>1</sup> (¹九大 院歯 口腔機能分子)

【目的】IL-1βは炎症性疼痛ならびにアルツハイマー病(AD)など慢性炎症が原因となる脳疾患の発症・進展に関与することが知られている。最近、私たちはクロモグラニンA(CGA)がミクログリアにおいてカテプシンB(CatB)依存的にIL-1βの産生分泌を誘導し、炎症性疼痛の原因分子となることを突き止めた(J Neurosci, 2012)。今回は、CGAならびに凝集型βアミロイド(fAβ42)のミクログリアにおけるIL-1β産生経路について検討を行った。【方法・結果】成熟型IL-1β産生にはNF-κB活性化(プロ型IL-1βの産生)ならびにカスパーゼ-1活性化(プロ型IL-1βの成熟型への変換)の2経路の活性化が必要である。CGAは培養ミクログリアにおいてNF-κBを活性化し、CatB依存的にカスパーゼ-1を活性化した。一方、fAβ42はCatBならびにNLRP3依存的にカスパーゼ-1を活性化したが、NF-κBの活性化はできなかった。さらに、ヒトAD脳においてAβ陽性老人斑と比較してCGA陽性老人斑周囲には有意に多数のCatBならびに成熟型IL-1β陽性のミクログリア集積が認められた。【結論】以上の結果より、CGAはミクログリアにおける成熟型IL-1βの強力な産生誘導因子として炎症性疼痛ならびにADなど慢性炎症が原因となる脳疾患の発症・進展に関与することが示唆された。

**O-103**

神経損傷後、脊髄後角に遊走浸潤する活性化ミクログリアはP2Y12シグナル経路で有髄神経軸索の貪食様作用を示す

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

【目的】神経因性疼痛モデル動物では傷害後7-14日に脊髄後角第2層に活性化ミクログリアが遊走浸潤する。この浸潤したミクログリアの動態について、免疫組織化学を用い微細形態学的に検索した。【方法】8週Wistar雄性ラットの第5腰椎後根神経節の脊髄神経末梢枝を結紮後切断し、術後7日、14日で灌流固定し、L5脊髄を摘出し、凍結および浮遊切片を作製し、iba-1, neuN, GFAP抗体を用いた免疫組織化学、免疫電顕で観察した。また軸索切除断端からビオチンデキストランを逆行性に取り込ませ、傷害軸索をマークし電顕標本とした。さらに末梢神経傷害後P2Y12Rインヒビターの脊髄腔内投与を実施し非傷害側と比較した。【結果】浸潤ミクログリアは高頻度に有髄軸索の髄鞘に接着しそれらを取り囲み、細胞内に取り込む貪食様作用を示した。これら活性化ミクログリアは傷害軸索、非傷害軸索ともに接着し貪食様作用を示すが、その頻度は傷害軸索の方が多かった。P2Y12Rインヒビターの脊髄腔内投与後、末梢神経傷害に続く活性化ミクログリアの浸潤は抑制されなかったが、軸索への接着貪食様作用は減少した。【考察】末梢神経傷害後の神経因性疼痛の発生には脊髄後角第2層に遊走浸潤してくる活性化ミクログリアの有髄神経髄鞘への接着貪食様作用が関与している可能性と共に、その反応はP2Y12シグナル経路の可能性が示唆された。

**O-104**

生体リズムを攪乱する「社会的時差ボケ」

○中村 渉<sup>1</sup>、高須 奈々<sup>1,3</sup> (大阪 院歯 口腔時間生物、<sup>2</sup>科学技術振興機構さきがけ、<sup>3</sup>日本学術振興会)

ヒトの生理機能は、一日周期で変動し環境変化に効率よく適応することで動的恒常性を維持している。哺乳類では視床下部視交叉上核に体内時計の中核が存在し、およそ24時間のサーカディアンリズム刻み、主に環境光の変化を網膜から入力することで正確な1日周期に調整している。一般生活を営む上で、社会的時刻と体内時計による生物学的時刻との乖離による「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、体内時計の攪乱を生じる因子として「社会的時差ボケ」のメカニズムを検証した。マウスを12時間\_12時間の規則正しい明暗環境条件下で飼育し輪回し行動を記録すると、毎日消灯時間後数分以内に活動を開始する極めて正確な日内リズムを示す。これらを5日間(平日)は6時~18時の明暗サイクルに置き、2日間(週末)を9時~21時の明暗サイクルにシフトするウィークリー社会的時差ボケをシミュレートした明暗環境に暴露した。結果、2日間の3時間時差から回復させた直後は、消灯後2.7時間後に活動を開始することが分かった。消灯時間を社会的起床時刻、実際の活動開始を生物学的起床時刻とすると、起床時間に乖離が生じたことになる。さらに、月曜日に生じた乖離は容易に解消されず、毎日活動開始時刻は消灯時間に近づくものの、完全に解消されるのは4サイクル後であった。1週間ごとに3時間の社会的時差ボケが生じることで、その影響は週全日に及ぶことが明らかになった。

**O-106**

Projections from the dorsal peduncular cortex to pain-receptive trigeminal caudal subnucleus in rats

○Akhter Fatema<sup>1</sup>、Haque Tahsinul<sup>1</sup>、佐藤 文彦<sup>1</sup>、加藤 隆史<sup>1</sup>、吉田 篤<sup>1</sup> (大阪 院歯 口腔解剖2)

This study clarified projections from the medial prefrontal cortex (mPFC) involved in orofacial pain processing in rats. We examined the mPFC neurons projecting directly to the trigeminal caudal subnucleus (Vc) and oral subnucleus which are known to receive orofacial nociceptive inputs. Only after injections of a retrograde tracer in the rostradorsomedial part of superficial layer of Vc (rdm-supVc), many neurons were labeled with an ipsilateral predominance in the rostrocaudal middle level of the dorsal peduncular cortex (midDP). After injections of an anterograde tracer in the midDP, many axons were labeled with an ipsilateral predominance in the rdm-supVc, periaqueductal gray (PAG), parabrachial nucleus (Pb), Koelliker-Fuse nucleus (KF) and trigeminal mesencephalic nucleus, and bilaterally in the solitary tract nucleus. Many axons were also labeled ipsilaterally in the caudal level of the granular and dysgranular insular cortex (GI/DI). These results suggest that intraoral nociceptive processing of Vc neurons may be regulated by the DP directly or indirectly through brainstem nuclei such as PAG, Pb and KF, and this regulation may interact with the caudal GI/DI neurons.

**O-105**

LSPS法による島皮質での興奮性入力の空間分布特性の解析

○小林 真之<sup>1</sup>、越川 憲明<sup>1</sup> (日大 歯 薬理)

島皮質は、味覚嫌悪学習など神経可塑性の制御に重要な役割を担っている。我々は、抑制性回路の中心的役割を果たす parvalbumin 陽性細胞の分布が島皮質において著しく偏っていることを報告し(Chen et al., 2010)、島皮質独自の特殊な抑制性神経回路が存在することを明らかにしつつある。今回我々は、caged glutamate を用いた laser scanning photostimulation (LSPS)法によって、島皮質に存在する錐体細胞と parvalbumin 陽性細胞と考えられる fast-spiking (FS)細胞に対する興奮性入力の特徴について明らかにしたので報告する。ラット島皮質スライス標本上のV層錐体細胞もしくはFS細胞から whole-cell patch-clamp 記録を行った。caged glutamate の灌流投与で紫外線レーザー光(半値幅25 μm)によって照射周辺のニューロンに活動電位を発生させ、その結果生じる興奮性シナプス後電流(EPSC)を記録した。照射領域を格子状に移動させることにより、V層の記録細胞にEPSCを発生させる領域マップを作成した。錐体細胞では、照射領域が記録細胞から離れるにしたがって急激にEPSCの振幅が減衰することが明らかとなった。一方FS細胞は、錐体細胞と比較して広範な領域から興奮性入力を受けていることが明らかとなった。これらの結果は、FS細胞が錐体細胞と比較して広範な領域からの興奮性入力を受けることにより高い活動性を示すことを示唆している。

**O-107**

ラット歯根膜由来骨格筋細胞はどこから生じたのか? ~初代培養における幹細胞の検証~

○富永 徳子<sup>1</sup>、中原 貴<sup>1,2</sup>、石川 博<sup>1,2</sup> (日歯大 生命歯 発生・再生、<sup>2</sup>日歯大 生命科学)

背景:我々はラット臼歯歯根膜の初代培養から、濾紙を用いて特定の細胞を分離する方法を確立し、セル・フィッシング法と名付けた(Tominaga N et al. Differentiation, 2013)。本手法により、ラット歯根膜の初代培養から骨格筋細胞の分離と同定に成功した。しかし、骨格筋細胞は生体内の歯根膜には存在しないため、初代培養を通じて歯根膜組織中の幹細胞から分化したと考えられる。本研究は、高い可塑性を有する幹細胞が初代培養中に存在すると仮定して検証を行った。方法:SDラット6週齢オス臼歯をシャーレに静置し、15% FBS含有DMEM/F12にて培養を行った。培養開始約1週間後、歯根周囲の歯根膜から細胞が遊走を始め、1.5ヶ月後にコンフルエントに達すると、複数の核を有する細胞集団が観察された。この多核細胞群をセル・フィッシング法にて分離し、継代培養を行った後、細胞を同定した結果、骨格筋細胞群であることが分かった。初代培養の細胞を用いて、免疫染色、RT-PCR、フローサイトメトリーにてNanog, Oct4, Sox2の発現を解析した。結果:初代培養におけるRT-PCRでは、Nanog, Oct4, Sox2の発現が確認された。また、免疫染色、フローサイトメトリーではOct4, Sox2陽性細胞が確認された。考察:ラット歯根膜の初代培養において、RT-PCR、免疫染色、フローサイトメトリーにて幹細胞マーカー遺伝子の発現を認めたことから、初代培養における幹細胞の存在が示唆された。

**O-108**

矯正の歯の移動時におけるアレルギー誘導性歯根吸収促進機構

○村田 直久<sup>1</sup>、五百井 秀樹<sup>1</sup>、大内 雅博<sup>1</sup>、合島 怜央奈<sup>2</sup>、沖 雄二<sup>2</sup>、山座 孝義<sup>2</sup>、高橋 一郎<sup>1</sup>、城戸 瑞穂<sup>2</sup> (<sup>1</sup>九大 歯 歯科矯正、<sup>2</sup>九大 歯 分子口腔解剖)

【目的】 矯正歯科治療における予期せぬ歯根吸収の機構は解明されていない。我々は、九大病院矯正歯科における疫学調査において、歯根吸収とアレルギー疾患との間に有意な関連があることを見出した。アレルギー誘導性歯根吸収の機構解明を目的として、アレルギー惹起歯根吸収モデルラットを作製し、破骨細胞の誘導との関連が知られている Th17 細胞関連サイトカインや脂質メディエーターの発現変化を検討した。【方法】 6 週齢 BN ラットに OVA 感作を行い、アレルギー疾患モデルを作製した。14 日後、上顎切歯と第一臼歯間 (M1) に coil spring を装着して矯正力を負荷し、24 時間後に M1 周囲歯槽骨を採取し、脂質および RNA の抽出を行い、ELISA 法および定量 PCR を用いて解析した。【結果と考察】 Coil spring を装着したアレルギー群では、OVA 非感作群、coil spring 非装着群および無処置群と比較して、IL-17 および IL-23 の発現上昇が認められた。さらに、ロイコトリエン B4 などの脂質メディエーターの発現量の上昇が認められた。これらの結果から、アレルギー惹起による歯周組織中の Th17 細胞関連サイトカインや脂質メディエーターなどのバランスの変化が、歯の移動による破骨細胞の分化誘導を伴う歯根吸収に影響していることが示唆された。

**O-110**

bisphosphonate 投与中止後の骨の細胞群における組織化学的検索

○坪井 香奈子<sup>1,2</sup>、佐々木 宗輝<sup>1</sup>、長谷川 智香<sup>1</sup>、北川 善政<sup>2</sup>、網塚 憲生<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北大 院歯 硬組織発生物、<sup>2</sup>北大 院歯 口腔内科)

骨粗鬆症治療薬である bisphosphonate (BP) は、破骨細胞を抑制する。しかし、破骨細胞の抑制が骨芽細胞とのカップリングに影響が及ぶこと、一方、BP 投与を中止すると破骨細胞形成のリバウンドが生じる可能性も危惧されている。そこで、我々は生後 6 週齢 ICR マウスへ 10 日間の alendronate 皮下投与を行い、投与中止後の骨組織において ALP、TRAP、スクレロシンなどの組織化学を行った。BP 投与直後のマウス大腿骨・脛骨では、コントロール群に比べて多数の TRAP 陽性破骨細胞が骨組織に存在していた。BP 投与中止後には破骨細胞は活発に骨吸収を行うのではなく、その数を減少させてゆき破骨細胞のアポトーシス像も観察されたことから、リバウンドの可能性は低いと考えられた。一方、骨芽細胞のマーカである ALP 陽性反応は速やかに回復せず、骨細胞はスクレロシンを多量に産生するとともに、自らは萎縮する傾向を示した。以上から、BP 投与中は破骨細胞の骨吸収抑制を補うために、何らかの機序で破骨細胞形成が亢進したと考えられた。一方、BP 中止により、破骨細胞数が速やかに回復したが、骨芽細胞・骨細胞系の回復には長期間を要すると推察された。よって、BP 投与後の骨組織の正常化には破骨細胞だけでなく、骨芽細胞・骨細胞の状態も考慮する必要があると考えられた。

**O-109**

歯根膜における骨髄由来細胞の局在と幹細胞マーカーの発現

○加来 賢<sup>1</sup>、北見 恩美<sup>1</sup>、井田 貴子<sup>1</sup>、秋葉 陽介<sup>1,2</sup>、魚島 勝美<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>新大 院医歯 生体補綴、<sup>2</sup>新大 医歯学総合病院)

歯根膜細胞の発生由来は神経堤を起源とする歯小囊であるため、発生初期の歯根膜を構成するほぼ全ての細胞は神経堤由来である。しかしながら加齢に伴い、歯根膜中の神経堤由来細胞の占める割合は減少することから、他の細胞源から細胞が供給されている可能性が示唆される。近年、代謝活性の高い間葉系組織において、骨髄に由来する Circulating-Mesenchymal Stem Cell (MSC) や、Pericyte が組織幹細胞として機能している可能性が示唆されている。本研究では、4 週齢の Green Fluorescent Protein (GFP) ラット SD-Tg(CAG-EGFP) の大腿骨より骨髄間質細胞を採取し、これを免疫不全ラット (F344/NJcl-rnu) の大腿骨骨髄腔に移植し、大腿骨骨髄から歯根膜への細胞供給の可能性について検討した。移植 4 週後の脱灰パラフィン包埋標本において、歯根膜中の歯槽骨側、血管近傍に GFP 陽性細胞が検出された。歯根膜中には間葉系幹細胞マーカー (CD29, SSEA4)、神経幹細胞マーカー (Hnk1)、Pericyte マーカー ( $\alpha$ SMA, PDGFR $\beta$ ) に陽性の細胞が検出されたが、GFP 陽性細胞中には CD29, SSEA4 陽性細胞のみが検出された。さらに GFP 陽性細胞は大腿骨骨髄腔内の海綿骨表面、小腸間質、腎臓皮質、皮膚の結合組織層においても検出され、Circulating-MSC の存在を示唆する結果を得た。以上の結果より、歯根膜の幹細胞には大腿骨骨髄の間葉系幹細胞が血行性に供給されるものが含まれる可能性が示唆された。

**O-111**

窒素含有ビスホスホネート製剤 (NBP) による破骨細胞の細胞融合阻害作用

○長岡 良礼<sup>1,2</sup>、鍛冶屋 浩<sup>1</sup>、佐々木 三奈<sup>1,2</sup>、永沼 香織<sup>2</sup>、堤 貴司<sup>1</sup>、府川 晃久<sup>1,2</sup>、岡本 富士雄<sup>1</sup>、岡部 幸司<sup>1</sup> (<sup>1</sup>福歯大 細胞分子生物、<sup>2</sup>福歯大 顎顔面外)

【目的】 NBP 関連顎骨壊死 (BRONJ) は長期 NBP 服用患者において、特に外科処置後に創傷治癒不全による顎骨の露出が継続し、骨壊死がみられる疾患である。しかし、発症機序に関しては未だ統一的な見解がない。近年、NBP は口腔角化上皮細胞、骨芽細胞及び線維芽細胞の分化・生存を抑制し、この原因には NBP によるプレニル化合物 (ゲラニルゲラニル酸 (GGOH) など) の減少が関与していることが示唆されている。従って、NBP による破骨細胞の分化・生存の抑制が骨リモデリングの障害を引き起こし、この結果 BRONJ 発症の一要因になるのではないかと推測した。そこで、本研究ではマウス破骨細胞分化過程に対する NBP とプレニル化合物促進物質の効果について検討した。【方法】 マウス骨髄細胞より破骨細胞前駆細胞を誘導し、RANKL 存在下でゾレドロン酸及び GGOH を加え培養、解析を行った。【結果と考察】 ゾレドロン酸は RANKL 誘導性の TRAP 陽性多核細胞への分化を阻害すると共に細胞融合分子の DC-STAMP や OC-STAMP の遺伝子発現を抑制した。しかし、GGOH 共存下では TRAP、DC-STAMP 及び OC-STAMP の発現の回復と共に TRAP 陽性破骨細胞の出現を認めた。以上より、NBP は破骨細胞の細胞融合及び多核化の抑制に関与していることが示唆され、プレニル化合物は NBP による破骨細胞分化・生存阻害を回復させると考えられ、この作用は BRONJ 発症の予防作用の一助となる可能性が示唆された。



## O-112

ミノドロン酸の同位体顕微鏡を用いた骨組織分布と破骨細胞に対する影響

○佐々木 宗輝<sup>1</sup>、本郷 裕美<sup>1</sup>、小林 幸雄<sup>2</sup>、塚本 尚義<sup>2</sup>、網塚 憲生<sup>1</sup> (北大院歯 硬組織発生物、<sup>2</sup>北大 創成研)

【緒言】近年、骨粗鬆症の治療にもちいられる月一回経口投与のビスフォスフォネート製剤が破骨細胞や骨芽細胞に与える影響を明らかにするため、我々は同位体顕微鏡でミノドロン酸の骨組織分布を観察すると共に破骨細胞の変化を組織化学的に検索した。【材料と方法】生後8週齢の雄性ICRマウスに安定同位体である<sup>15</sup>Nを標識したミノドロン酸を外頸静脈から投与し、3時間、24時間、1週間、1ヶ月後に灌流固定を行いパラフィンまたはエポキシ樹脂に包埋した。切片作成後、同位体顕微鏡によるミノドロン酸の骨組織分布の観察、ならびにALP/TRAP、TRAP/カテプシンKの二重染色を行った。【結果と考察】ミノドロン酸は骨幹端骨梁の形成面ならびに吸収面の両方の骨表面に認められた。投与直後から1週間後では成長板近くの一次骨梁表面に、1ヶ月後では二次骨梁の骨表層内部に局在する傾向を示した。ミノドロン酸投与24時間以内では、ALP/TRAPおよびTRAP/カテプシンKの局在性は大きく変化しなかった。しかし、1週間・1ヶ月後では、破骨細胞におけるTRAPとカテプシンKの局在が一致しなくなり、一部、アポトーシスを示した。ALP陽性骨芽細胞は、1週間後では扁平化した。1ヶ月後ではふよやかな形態を示すものが局所的に観察された。従って、ミノドロン酸は、骨質に広範囲に結合すること、骨吸収抑制があるが破骨細胞の障害性が低いことから、骨芽細胞とのカップリングを維持するものと推測された。

## O-114

アレンドロネート直接作用による骨芽細胞分化の制御

○小松 浩一郎<sup>1</sup>、島田 明美<sup>1</sup>、柴田 達也<sup>1</sup>、中島 和久<sup>1</sup>、網塚 憲生<sup>2</sup>、二藤 彰<sup>3</sup> (鶴見大 歯薬理、<sup>2</sup>北大 院歯 硬組織発生物、<sup>3</sup>放医研)

【目的】我々はビスホスホネートBP(アレンドロネート、ALN)が細胞内取込みを介し骨芽細胞分化を促進することをin vitro及びin vivoで示した。BPによる骨芽細胞分化促進のメカニズムとしてはERKのリン酸化あるいはsmall GTPaseの非プレニル化を介する経路が想定されている。今回、我々はBPの細胞内取込みとこれらの経路の関係を解析した。【方法】初代骨芽細胞における蛍光ラベルしたALN(F-ALN)の取込みならびにALNによる骨芽細胞の分化と石灰化を確認し、これらの効果に及ぼすエンドサイトーシス阻害剤ダンシルカダバリン(DC)、ならびにプレニル化回復剤ゲラニルゲラニオール(GO)の影響を調べた。更に、骨芽細胞様細胞におけるALNによるERKのリン酸化ならびにRap1Aの非プレニル化をウエスタンブロットによって解析した。【結果】ALNは骨芽細胞のオステオカルシン発現と石灰化を促進した。DCおよびGOはこれらの効果を抑制した。ALNはERKのリン酸化を促進したが、この作用のDCによる阻害は認められなかった。ALNはRap1Aの非プレニル化を起こした。この作用をDC及びGOは阻害した。【考察】本結果はBPが細胞内取込みを介し骨芽細胞の分化を促進することを示唆する。この効果はメバロン酸経路の抑制による可能性がある。

## O-113

窒素非含有 bisphosphonates (non-N-BPs)の骨吸収抑制作用とは関連しない鎮痛効果：リン酸トランスポーター関与の可能性

○島 和弘<sup>1</sup>、山本 照子<sup>1</sup>、菅原 俊二<sup>2</sup>、遠藤 康男<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東北大 院歯 顎口腔矯正、<sup>2</sup>東北大 院歯 口腔分子制御)

骨粗鬆症における苦痛は痛みである。N-BPsの骨吸収抑制作用はnon-N-BPsより遥かに強力だが、藤田らは骨粗鬆症や変形性関節炎患者で、non-N-BPのetidronateはN-BPsよりも強い鎮痛効果を示すと報告し、動物実験でも同様の報告がある。私達もマウスでの鎮痛効果はnon-N-BPs(etidronateとclodronate)>>N-BPsを確認し、non-N-BPsの神経への直接作用を示唆した(Kim et al. 2013)。機序として、BPsに関する私達のこれまでの研究から、リン酸トランスポーター(Pi-TP)の関与を想定した。発痛性神経伝達物質のGluやATPはPi-TPのSLC17を介して神経小胞内に取り込まれる。本研究ではマウスでの0.7%酢酸とcapsaicinに対する痛み反応を指標に、“SLC17のnon-N-BPsによる抑制”を検証した。【結果】(1)Pi-TPのSLC20/34を阻害するphosphonoformateは、non-N-BPsの鎮痛作用を消失させた。(2)Non-N-BPsは脊髄クモ膜下腔内投与で鎮痛作用を示し、この鎮痛作用はNMDAとの同時投与で解消された。(3)Pi-TPのSLC17を組み込んだliposomeでのATPの取り込みをnon-N-BPsは抑制した。【考察】上記結果は、“non-N-BPsはSLC20/34を介して神経に取り込まれ、小胞膜SLC17を阻害して小胞内Glu/ATPを減少させ、鎮痛効果を示す”との仮説を支持する。

## O-115

Zoledronateの軟組織細胞への取り込み：リン酸 transporter 関与の可能性

○岡田 諭<sup>1,2</sup>、木山 朋美<sup>1,3</sup>、大泉 丈史<sup>2</sup>、佐々木 啓一<sup>3</sup>、高橋 哲<sup>2</sup>、菅原 俊二<sup>1</sup>、遠藤 康男<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大 院歯 口腔分子制御、<sup>2</sup>東北大 院歯 顎顔面・口腔外科、<sup>3</sup>東北大 院歯 口腔システム補綴)

【背景】窒素を含むbisphosphonates(N-BPs)の骨吸収抑制作用は、窒素のないnon-N-BPsよりも遥かに強い。しかし、N-BPsには顎骨壊死の副作用がある。In vitroでN-BPsは種々の軟組織細胞に取り込まれ細胞毒性を示す。私達は、N-BPsはマウス軟組織で炎症壊死作用を示し、一方、non-N-BPsのetidronate(Eti)とclodronate(Clo)は、N-BPsの炎症壊死作用を抑制することを発見した。今回は、これらの機序解明を目的に、マウス耳介局所での炎症壊死作用を指標に、zoledronate(Zol、最強のN-BP)とBP関連物質の併用効果を調べた。【結果】Oxidronate(Oxi, non-N-BP)と高濃度ピロリン酸(PPi)も炎症壊死作用を示し、EtiとCloはこれらも抑制した。低濃度PPiはOxiの作用を抑制したが、Zolには無効だった。Phosphonoformate(PFA) [リン酸 transporter (Pi-TP)のSLC34阻害剤。高濃度でSLC20も阻害]はOxiとPPiには無効だが、Zolの作用を強く抑制した。検討した種々のアミノ酸・カルボン酸にZolに対する有意な抑制効果はみられなかった。【考察】Pi-TPにはSLC-17, -20, -34の3つのfamilyがある。上記結果は以下を示唆する。(i) ZolはSLC34/20を介して細胞内に入る。(ii) OxiとPPiはSLC17を介して細胞内に入る。(iii) EtiとCloはこれら全てのPi-TPを抑制する。

**O-116**

Tbx1 は口腔粘膜上皮の病的癒着と口蓋発生に関与する  
 ○船戸 紀子<sup>1</sup> (東医歯大 医歯共同セ 疾患遺伝子)

【目的】 T-box 型転写因子をコードする *TBX1* は、22q11.2 欠失症候群の疾患遺伝子である。同症候群では顔貌所見として、両眼隔離、小顎症、低耳介、耳介変形、口蓋裂を認める。同症候群の口蓋裂の病因を解明するため、*Tbx1* 遺伝子改変マウスを用いて、口蓋の発生について検討した。【方法】 *Tbx1* 遺伝子改変マウス、各種トランスジェニックマウス、レポーターマウスを用いて、形態学的観察を行った。また、アデノウイルスを感染させた上皮細胞を用いて、フローサイトメーター解析を行った。【結果】 (1) *Tbx1* 遺伝子欠損マウスは、口蓋裂の他、粘膜下口蓋裂、不完全口蓋裂を示した。また、口蓋粘膜上皮と下顎との病的癒着を認めた。一方、同マウスでは間葉系細胞の増殖が抑制されていた。(2) 口蓋粘膜に *Tbx1* の発現を認めるため上皮特異的に *Tbx1* を欠損させたところ、口蓋前方部の口蓋裂を認めた。(3) *Tbx1* 遺伝子欠損マウスでは口蓋発生時に口腔上皮の増殖も亢進し、上皮細胞の分化に異常を認めた。(4) *Tbx1* が口蓋板における *Bmp4* や *Pax9* の発現に関与した。(5) *Tbx1* の強制発現により上皮細胞の増殖が抑えられ、*Tbx1* が細胞周期調節に関与することが分かった。【結論】 *Tbx1* は口蓋発生の過程で、口蓋粘膜増殖分化の制御に役割を果たし、口腔粘膜の病的癒着を防ぐことが示唆された。(非会員共同研究者：Hiromi Yanagisawa、中村正孝、Deepack Srivastava)

**O-117**

温度感受性 TRP チャネルによる口腔粘膜の新しい創傷治癒機構  
 ○合島 怜央奈<sup>1,2,3</sup>、大崎 康吉<sup>1</sup>、張 旌旗<sup>1</sup>、木附 智子<sup>1</sup>、村田 直久<sup>1</sup>、城戸 瑞穂<sup>1</sup> (九大 院歯 分子口腔解剖、<sup>2</sup>佐賀大 医歯科口腔外科、<sup>3</sup>佐賀大 医 生体構造機能 組織神経解剖)

【目的】 TRPV3 チャネルは温度センサーとして知られ、32°C 以上の温かい温度で活性化される非選択的な陽イオンチャネルである。我々はこれまでに TRPV3 が口腔上皮細胞に高発現し、口腔内の温度環境を積極的に感知していることを明らかにしてきた。本研究では口腔粘膜に生じた傷の治りが速やかであることに着目し、この速やかな治癒に「口腔内の温度環境とそれを感じ受する TRPV3 チャネルが関与する」との仮説を立てた。【方法】 C57BL/6 の上顎第一臼歯を抜歯する創傷モデルを作製し、創部での TRPV3 の発現を調べた。粘膜治癒に重要な役割を担う上皮細胞の増殖と TRPV3 の関係を明らかにするため、野生型マウス (WT) と TRPV3 遺伝子欠失マウス (V3KO) より調整した培養口腔上皮細胞を用い、TRPV3 を活性化する刺激が増殖能へ与える影響を調べた。また WT と V3KO における抜歯後の粘膜治癒を比較した。【結果と考察】 創部粘膜では TRPV3 mRNA およびタンパクの発現が上昇していた。口腔上皮細胞を TRPV3 アゴニストで刺激すると細胞数が増加し、さらにアゴニストおよび温度刺激により細胞増殖マーカー陽性細胞数が増加した。また V3KO では WT と比較し口腔粘膜の増殖マーカー陽性細胞数が減少していた。さらに V3KO の粘膜治癒は WT より遅延していた。以上より、口腔粘膜には温度を感知する機能的な TRPV3 チャネルが発現し粘膜の創傷治癒に寄与している可能性が示唆された。

**O-118**

味蕾 3 型細胞分化における Mash1 による GAD67 発現調節  
 ○鬼頭 文恵<sup>1,2</sup>、瀬田 祐司<sup>1</sup>、豊野 孝<sup>1</sup>、片岡 真司<sup>3</sup>、柿木 保明<sup>2</sup>、豊島 邦昭<sup>1</sup> (九歯大 口腔組織、<sup>2</sup>九歯大 老年障害者歯科、<sup>3</sup>九歯大 頭頸部構造解析)

Mash1 は神経細胞分化初期に神経前駆細胞から神経細胞への運命決定に働く。その中で中枢神経系では Mash1 により *Dlx* 発現が誘導され、*Dlx* が GAD67 発現を誘導することが知られている。味蕾にも Mash1 と GAD67 の発現が認められ、中枢神経系と同様の調節機構が存在することが推測される。本研究では、味蕾細胞分化における Mash1 の GAD67 制御機構について検討した。Mash1 ノックアウト GAD67-GFP (Mash1KO GAD67-GFP) マウスを作製し、胎生期の有郭乳頭、軟口蓋味蕾における GAD67 発現の変化を比較した。さらに *Dlx5* 発現についても検索した。胎生 19 日齢の Mash1KO GAD67-GFP マウスの有郭乳頭、軟口蓋上皮の味蕾において GAD67 の発現が消失した。胎生 19 日の軟口蓋上皮には、Mash1KO、野生型マウスともに味蕾が観察された。味蕾の各細胞マーカーで Mash1KO マウスにおける味蕾細胞分化について検索すると、2 型細胞マーカーである *gustducin* 発現細胞の数は野生型マウスと差が認められなかったが、3 型細胞マーカーである AADC と GAD67 の味蕾における発現が消失した。また、胎生期の有郭乳頭において野生型マウスで *Dlx5* の発現が認められたが、Mash1KO マウスでは *Dlx5* の発現が認められなかった。本研究により Mash1 が味蕾 3 型細胞における GAD67 の発現に関与していることがわかった。また、中枢神経系と同様に味蕾細胞において Mash1 が *Dlx* 発現を誘導し、さらに *Dlx* が GAD67 の発現を誘導するカスケードが存在することが示唆された。