

## Stem and progenitor cells for tooth renewal

Irma Thesleff

Inst. of Biotechnol., Univ. of Helsinki

The capacity to generate new teeth has been reduced during evolution. Humans, like most other mammals can replace teeth once, while many fish and reptiles have the ability to replace teeth continuously. In addition, some mammals have teeth which grow continuously. This mode of tooth renewal compensates for tooth wear. We have examined the mechanisms of the renewal of the mouse incisor and focused our research on the epithelial stem cell niche located in the labial cervical loop. We have used mouse mutants and *ex vivo* cultures of cervical loops allowing the manipulation of signal pathways. These studies demonstrated that the maintenance and differentiation of the epithelial stem cells is regulated by a complex network of stimulatory and inhibitory molecules affecting Fgf, Tgfbeta, and Bmp signal pathways. We have discovered that stem cells in the cervical loop express the stem cell marker *Sox2* and that the *Sox2* positive cells contribute to all epithelial cell lineages of the incisor.

Replacement teeth develop in succession from the dental lamina associated with the enamel organ epithelium of the preceding tooth. Because mice do not replace their teeth, we have used the ferret as a model and studied the replacement of its deciduous canine and three deciduous premolars. We performed morphological and molecular analyses of tooth replacement and verified the initiation of replacement teeth from the successional dental lamina at the lingual aspect of the deciduous tooth germ during cap stage. We discovered that *Sox2* is a marker gene also for the successional lamina in the ferret. In addition *Sox2* was expressed in the successional dental lamina in human deciduous teeth as well as in several reptile species during continuous replacement tooth formation. Interestingly, *Sox2* expression was detected in ferret and mice also in the permanent tooth germs at the lingual aspect of their enamel organ indicating that there may exist capacity for continued tooth replacement in mammals. In addition, *Sox2* expression is associated also with the sequential formation of mouse molars from the posterior aspect of the preceding molar. This type of successional formation of teeth in fact resembles tooth replacement, and may be used as a model system for tooth replacement. We showed by lineage tracing that the mouse 2nd and 3rd molars developed from the *Sox2* positive cells of the 1st molar.

## Vascular endothelial growth factor controls formation and homeostasis of bone

Bjorn R. Olsen  
Harvard Sch. of Dent. Med.

Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) is a critical regulator of bone development, homeostasis and repair. During embryonic development it stimulates membranous bone formation<sup>1</sup>. During endochondral bone formation it is expressed at low levels in the cartilage models of the future bones where it serves as a survival factor for hypoxic chondrocytes<sup>2</sup>. As the cartilage models grow hypertrophic chondrocytes in their centers express high levels of VEGF-A. In a paracrine fashion this VEGF-A stimulates migration of osteoclastic, osteoblastic and hematopoietic progenitor cells and sprouting endothelial cells from the perichondrium into the hypertrophic cartilage. During this process of endochondral ossification, VEGF-A is also expressed by the osteoblastic progenitor cells that migrate into the hypertrophic cartilage where they differentiate into the osteoblasts and osteocytes of the primary spongiosa<sup>3,4</sup>. This osteoblast-derived VEGF-A, as well as the VEGF-A that is produced by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in postnatal bones, is critical for regulating the proliferation and differentiation of osteoblasts. By targeting the early phases of osteoblastic differentiation in mice and eliminating VEGF-A expression in preosteoblastic mesenchymal stem cells, we have discovered that VEGF-A stimulates osteoblastic differentiation by an intracellular (intracrine) mechanism<sup>4</sup>. At the same time it represses adipocyte differentiation. These effects of intracellular VEGF-A are mediated by the transcription factors Runx2 and PPAR $\gamma$ . Low levels of VEGF-A in mesenchymal stem cells are associated with low levels of Runx2 protein and activity and increased levels of PPAR $\gamma$ <sup>4</sup>. Mice with VEGF-A deficiency in Osterix-positive osteoblastic progenitor cells exhibit an osteoporosis-like phenotype with reduced bone density and increased bone marrow fat<sup>4</sup>. Since decreased levels of the nuclear envelope protein lamin A/C are known to result in decreased bone formation and increased bone marrow fat<sup>5,6</sup>, we examined the possibility of an interaction between lamin A/C and intracellular VEGF-A. The data indicate that there is reciprocal functional interaction between VEGF-A and lamin A/C: lamin A/C stimulates VEGF-A levels, while VEGF-A represses levels of Lamin A/C<sup>4</sup>. Interestingly, levels of lamin A/C in osteoblasts and bone marrow cells are lower in cells from old mice than in young mice<sup>7</sup>, and levels of VEGF-A decrease with age in bone marrow-derived stem cells<sup>8</sup>. Further studies of the molecular mechanisms underlying this intriguing connection between intracellular VEGF-A, lamin A/C and osteoblast/adipocyte differentiation are likely to result in the identification of novel targets of therapies to prevent and treat osteoporosis.

References:

- 1) Zelzer E, McLean W, Ng Y-S, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, *et al.* Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*. 2002; 129: 1893-904.
- 2) Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development*. 2004; 131: 2161-71.
- 3) Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, *et al.* Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell*. 2010; 19(2): 329-44. Epub 2010/08/17.
- 4) Liu Y, Berendsen AD, Jia S, Lotinun S, Baron R, Ferrara N, *et al.* Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest*. 2012; 122(9): 3101-13. Epub 2012/08/14.
- 5) Li W, Yeo LS, Vidal C, McCorquodale T, Herrmann M, Fatkin D, *et al.* Decreased bone formation and osteopenia in lamin a/c-deficient mice. *PLoS One*. 2011; 6(4): e19313. Epub 2011/05/07.
- 6) Boguslavsky RL, Stewart CL, Worman HJ. Nuclear lamin A inhibits adipocyte differentiation: implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet*. 2006; 15(4): 653-63. Epub 2006/01/18.
- 7) Duque G, Rivas D. Age-related changes in lamin A/C expression in the osteoarticular system: laminopathies as a potential new aging mechanism. *Mech Ageing Dev*. 2006; 127(4): 378-83. Epub 2006/02/01.
- 8) Wilson A, Shehadeh LA, Yu H, Webster KA. Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics*. 2010; 11: 229. Epub 2010/04/09.

L-1

バイオイメーシングから展開する感染  
制御研究

寺尾 豊

新大 院医歯 微生物感染症

Y-1

骨組織中でのライブイメーシングを用  
いた自律性細胞内カルシウムオシレ  
ーションの検討

石原 嘉人

岡大 院医歯薬 歯科矯正

抗生剤が実用化されて一世紀を迎えようとしている。その抗生剤の歴史には、絶えず耐性菌の出現が伴い、今や多剤耐性菌が高頻度に分離されている。そして、院内感染症の原因として大きな問題となっているが、抜本的な対策を講じることができていない。そこで、「脱抗生剤医療」を長期的な展望とした基礎研究を推進している。具体的には、(1) 抗生剤の補助療法を目指す万能型抗体の開発、(2) 新規免疫系を誘導し免疫療法へと展開する研究、そして、(3) DNA 素材のワクチンアジュバントの開発を遂行している。本講演では、これら研究課題の基礎的成果を概説し、討論の俎上に供したいと考えている。

最初に紹介する万能型抗体は、抗原特異性を担う抗体の領域を、広範な抗原認識能を有する自然免疫系レセプターと置換し、キメラ抗体を開発する研究である。抗体の食細胞のオプソニン化を促す領域に、Toll 様受容体の各種細胞外ドメインを結合した遺伝子配列を設計し、現在までに複数種の細菌に対して作動する構造体を得ることができている。

次に紹介する新規免疫系は、好中球の細胞死に伴う NETs である。はじめに、誤嚥性肺炎の起原菌である肺炎球菌に着目し、同感染症の病態をマウスモデルで検索した。その結果、感染肺組織に多量の好中球が浸潤し、NETs が展開されることが確認された。そこで、好中球の NETs 免疫作動因子について、肺炎球菌の分子群から同定を試みた。その結果、肺炎球菌の  $\alpha$ -enolase が NETs 誘導能を有すること、およびオプソニン効果を亢進させることが明らかになった。

最後に発表予定の課題は、「DNA オリガミ」型ワクチンアジュバントの開発である。「DNA オリガミ」法は、一本鎖型 DNA に相補 DNA を編み込んで、DNA を任意の二次元構造に加工する技術である。この技術を用いて、免疫活性化作用のある CpG モチーフを機能的に配置するデザインを構築している。現在のところは、萌芽的な試みと予備的なデータを報告させていただき段階でしかないが、「DNA オリガミ」のアジュバント効果が証明されれば、実用化済みの様々なワクチンの量的減少にも繋がる可能性があり、ワクチンで問題とされる副反応の懸念も減弱できると推察している。

カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は細胞内外における主要な情報伝達物質であり、様々な刺激に応じて周期的な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を引き起こす。この現象は  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと呼ばれ、その時空間的な特性は骨代謝調節を含む広範な生理機構に関与すると考えられている。しかし、三次元的な骨芽細胞-骨細胞ネットワークから成り立つ骨組織中でのリアルタイムな観察は、細胞周囲の骨基質が障壁となるため不明であった。本研究は、生きた骨組織を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  イメーシングを行い、組織中に存在する骨芽細胞と骨細胞の自律性細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションについて、その時空間的な特性の解析を行った。さらにそれらの現象に対する制御機構について、細胞内情報伝達系の一つである小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプと細胞間情報伝達の調節因子であるギャップ結合 (GJ) に着目して検討した。

解析は、ニワトリ胚頭蓋骨中の骨芽細胞および骨細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬を取り込ませた後、蛍光輝度の上昇を指標に行った。観察は共焦点レーザー顕微鏡を用い、3 秒間隔のタイムラプス解析を行った。小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ阻害剤および GJ 阻害剤を前投与し、細胞応答の比較検討を行った。その結果、15.6% の骨芽細胞および 7.0% の骨細胞に自律性細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションを認めた。小胞体カルシウムポンプを阻害した結果、骨芽細胞と骨細胞の細胞応答率と反応頻度は有意な減少を示した。GJ を阻害した結果、骨芽細胞の細胞応答に変化を認めなかったが、骨細胞はその反応率において有意に減少した。

以上の結果から、骨組織中の骨芽細胞と骨細胞には自律性細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが存在し、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプおよび GJ を介した伝達系の一部が明らかとなった。本実験系は細胞間コミュニケーションなどの生体システムを維持しており、より生体を反映した結果であると考えられる。また、本講演では機械的刺激を与えた場合における応答変化についての知見を交えて紹介したい。

Y-2

SUMO 化修飾による BMP 応答能の制御

雪田 聡<sup>1)</sup>、細矢 明宏<sup>2)</sup>、片桐 岳信<sup>3)</sup>、中村 浩彰<sup>2)</sup><sup>1)</sup>静大 教育、<sup>2)</sup>松歯大 解剖 2、<sup>3)</sup>埼玉医大 ゲノム 病態生理

SUMO (Small ubiquitin related modifier) 化修飾は、ユビキチン化に類似したタンパク質翻訳後修飾であり、SUMO 化修飾を受けた標的タンパク質はその安定性や活性、局在などが変化することが報告されているが、SUMO 化修飾が BMP 刺激による骨芽細胞分化の促進にどのような役割を担っているかは未だ報告がない。

そこで我々は、SUMO 化修飾による骨芽細胞分化調節機構を明らかにする目的で免疫化学的および分子生物学的な解析を行った。マウスを用いた SUMO-1 タンパク質の免疫染色の結果から、骨膜付近の線維芽細胞様細胞に陽性反応が認められる一方で、骨芽細胞では局在を示すシグナルが減弱する傾向を認めた。骨芽細胞分化における SUMO 化修飾の役割を明らかにするため、マウス筋芽細胞由来培養細胞株 C2C12 細胞を用いて、SUMO 化修飾に必須の酵素である UBC9 を siRNA によりノックダウンした。UBC9 のノックダウンにより、SUMO 化修飾を受けるタンパク質は減少し、BMP 添加時のアルカリホスファターゼ活性や骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現が上昇した。さらに、DNA マイクロアレイによる網羅的な解析により、SUMO 化修飾の阻害は BMP 刺激による骨芽細胞分化の促進および筋細胞への分化の阻害の両方を増強していることが明らかになった。UBC9 のノックダウンは BMP シグナルの伝達を促進し、SUMO 化修飾を受けないようにアミノ酸を置換した変異型 Smad4 は、野生型と比べ BMP シグナルの伝達活性が強くなることを見出した。以上のことから、Smad4 の SUMO 化修飾は BMP 刺激による骨芽細胞分化を抑制的に調節していると考えられた。

本研究は、SUMO 化修飾が BMP シグナルの抑制を介して骨芽細胞分化を制御していることを明らかにした。Smad4 の SUMO 化制御機構や、他のタンパク質の SUMO 化修飾による制御が骨芽細胞分化に与える影響を検討することにより、今後、骨芽細胞分化のメカニズムがより詳細に明らかになることが期待される。

Y-3

*E2f1* 欠損型 NOD/SCID マウスは唾液腺の腺房/導管の構造変化と AQP5 の発現レベル低下により口腔乾燥症を呈する

佐藤慶太郎

獨協医大 医 生理

口腔乾燥症は唾液分泌低下を主訴とする病態の一つであり、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* をノックアウトした *E2f1* 欠損型 NOD マウスは NOD マウスより顕著に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。そこで、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、口腔乾燥症の病態と唾液分泌低下のメカニズムを解析した。

ピロカルピンの腹腔内投与により口腔内へ分泌された唾液量を測定すると、*E2f1* 欠損型 NOD/SCID マウス (変異) 群は NOD/SCID マウス (対照) 群に比べ低下していた。絶食後の摂餌時の飲水行動をビデオ撮影し解析すると、固形飼料摂餌時の飲水回数は変異群のほうが対照群に比べ増加していた。一方、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、変異群は乾燥固形飼料の摂取が困難になり、口腔乾燥症の病態を呈することが示唆された。唾液腺を組織学的に検討すると、変異群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。水チャンネルであり、腺房細胞マーカータンパク質である AQP5 の唾液腺における発現を免疫プロット法により検討すると、変異群は対照群に比べて発現レベルが低下していた。AQP5 の唾液腺腺房細胞における局在を免疫組織化学的に検討すると、腺腔側膜に局在する対照群と異なり、変異群では腺腔側膜から細胞質へ拡散していた。さらに唾液腺においてユビキチン化した AQP5 を免疫沈降法と免疫プロット法により検出すると、変異群で AQP5 のユビキチン化が認められた。以上より、変異群の唾液腺において AQP5 の一部がユビキチン化し分解が促進され、発現レベルが低下することが示唆された。

これらの結果から、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。



Y-4

モノカルボン酸トランスポーター-1  
はインターロイキン-1 $\beta$ で刺激した軟  
骨細胞様 ATDC5 細胞の後期 NF- $\kappa$ B  
活性化および食細胞型 NADPH オキ  
シダーゼの発現によって誘導される細  
胞死に必要である

吉村健太郎

昭大 歯 口腔生化

変形性関節症などの軟骨変性疾患において、炎症性サイトカインが活性酸素種 (ROS) の産生を誘導し、軟骨細胞死に関与することが指摘されている。しかし、軟骨細胞における ROS 産生メカニズムは未だ十分解明されていない。我々は、IL-1 $\beta$  がマウス軟骨細胞で ROS 産生酵素のひとつである食細胞型 NADPH-oxidase (NOX-2) の発現を誘導し、NOX 阻害剤が IL-1 $\beta$  による細胞死を抑制することを報告した。今回、軟骨細胞様 ATDC5 細胞に NOX-2 siRNA を導入したところ、IL-1 $\beta$  による細胞死が抑制された。これは ROS 産生源としての NOX-2 の重要性を示唆する。また、IL-1 $\beta$  刺激した ATDC5 細胞で、NOX-2 発現に先立ち、乳酸産生と MTT 法におけるホルマザン生成の上昇が観察された。これは、乳酸がミトコンドリアのエネルギー代謝を上昇させた可能性を示唆する。そこでミトコンドリア内膜でこれらの酸の輸送を担う monocarboxylate transporter-1 (MCT-1) の siRNA を導入したところ、IL-1 $\beta$  による NOX-2 発現誘導が消失した。また、NOX-2 発現が IKK 阻害剤で抑制されたことから、NF- $\kappa$ B が NOX-2 発現に関わると考えられた。IL-1 $\beta$  刺激した ATDC5 細胞では、刺激直後の NF- $\kappa$ B 活性化に加え、刺激後 36 時間以降に I- $\kappa$ B $\alpha$  の消失、RelA の核内移行および NOX-2 発現が観察された。MCT-1 siRNA はこの後期 NF- $\kappa$ B 活性化を抑制した。また、IL-1 $\beta$  刺激 16 時間以内に ROS 産生のわずかな上昇が認められたが、MCT-1 siRNA はこれも抑制した。以上より、IL-1 $\beta$  で産生が亢進した乳酸が MCT-1 を介してミトコンドリアに取り込まれ、電子伝達系由来の ROS 産生を高めることで後期 NF- $\kappa$ B 活性化を起こし、その結果、NOX-2 の発現とそれに依存した細胞死を誘導したと考えられる。今回の結果は、MCT-1 による遺伝子発現調節に関する初めての知見であるばかりでなく、MCT-1 が軟骨変性抑制の新たな標的となる可能性を示唆するものである。

Y-5

ヒト骨芽細胞における  $\alpha_1$  アドレナリン  
受容体のシグナル経路と生理機能

兒玉 大介

愛院大 歯 薬理

近年の研究により、骨代謝制御に Ca 代謝調節ホルモンなどの液性因子に加えて、交感神経が直接的に関与していることが示されてきた。骨芽細胞・破骨細胞ともに  $\alpha_1$ -、 $\alpha_2$ -、 $\beta_2$ -アドレナリン受容体 (AR) が発現しており、交感神経活性の亢進による骨量の減少や、 $\beta$  作動薬による骨吸収の亢進など、我々の研究室を含む多くの研究室が、 $\beta$ -AR を介して骨量が負に制御されている可能性を示している。一方で、 $\alpha$ -AR の骨代謝制御における役割はあまり報告されていない。本研究ではヒト骨芽細胞における  $\alpha_1$ -AR のシグナル経路およびその生理機能を明らかにすることを目的とした。

ヒト骨膜由来正常骨芽細胞 SaM-1 を用いて、交感神経伝達物質である noradrenaline (NA) の作用を検討した。膜電流の変化をホールセルパッチクランプ法で、細胞内 Ca 濃度変化を Ca 感受性蛍光色素 CaL-520 による Ca イメージング法で記録した。

NA の適用によりホールセル電流の抑制がみられた。ホールセル電流抑制作用は  $\alpha_{1B}$ -AR 選択的阻害薬および K チャネル阻害薬によって阻害された。またホスホリパーゼ C (PLC) 阻害薬で影響を受けず、Gi/o 共役型受容体阻害薬 pertussis toxin および G $\beta\gamma$  タンパク阻害薬によって阻害されたことから、Gi/o 共役型  $\alpha_{1B}$ -AR の G $\beta\gamma$  サブユニットを介した K チャネル抑制作用が示唆された。一方で、Ca イメージング法では NA による細胞内 Ca 濃度上昇作用もみられた。細胞内 Ca 濃度上昇は  $\alpha_{1B}$ -AR 阻害薬および PLC 阻害薬によって抑制されたことから、K チャネル抑制作用とは独立した作用であり、Gq 共役型の  $\alpha_{1B}$ -AR を介した作用であると考えられた。生理機能として細胞増殖活性に与える影響を BrdU 法、WST assay によって検討したところ、 $\alpha_1$ -AR を介した細胞増殖活性の亢進がみられた。これは PLC 阻害薬の影響を受けず、K チャネル阻害薬や G $\beta\gamma$  タンパク阻害薬によって抑制された。以上の結果より、ヒト骨芽細胞において Gq 共役型・Gi/o 共役型の  $\alpha_{1B}$ -AR がともに存在し、Gi/o 共役型  $\alpha_{1B}$ -AR を介した K チャネル抑制作用により、細胞増殖活性が上昇する可能性が示された。

ML-1

Research at the Faculty of Dentistry,  
University of Toronto  
Daniel Haas  
Fac. of Dent., Univ. of Toronto

This presentation will provide a brief overview of research conducted at the Faculty of Dentistry, University of Toronto, with a focus on studies published by Professor Haas. The Faculty of Dentistry is very active in research and has established a Dental Research Institute (DRI). The DRI develops strategies for healing and repairing tissues, and advances our scientific knowledge of craniofacial health and its implications on systemic disease. Our research is conducted in an interdisciplinary setting through our strengths which can be categorized in several themes, namely: biomaterials; diagnostic and therapeutic technologies; education research; growth development and regeneration; health status and clinical outcomes; oral health and disease pathogenesis; and pain and neurosciences. The DRI has approximately 70 full time faculty and 100 students involved in its research activities. The DRI researchers received over \$8,000,000 (Canadian dollars) in grants in 2011-2012, and had well over 100 peer-reviewed publications. It is the leading school in Canada with respect to publications and citations in dentistry. Our school hosts an annual research day with 60 to 70 student poster presentations.

The research conducted by Professor Haas involves studies on analgesia, sedation and anesthesia in dentistry. Most specifically, his studies have focused on the potential for local anesthetic neurotoxicity. These have included a retrospective evaluation of the incidence of paresthesia from 1973 to 1993 in Ontario, Canada. The conclusion was that there was an overall incidence of one paresthesia out of every 785,000 injections. Compared with the other local anesthetics, a statistically significant higher incidence was noted when either articaine ( $\chi^2$ ,  $p < 0.002$ ) or prilocaine ( $\chi^2$ ,  $p < 0.025$ ) was used. These are both 4% solutions in Canada. The lingual nerve was involved in 64% of the cases, with the inferior alveolar nerve involved in the vast majority of the remainder. A follow-up study was done using the same methodology with the data from 1994 to 1998, with very similar conclusions in that prilocaine

and articaine were more commonly associated with paresthesia. The lingual nerve was involved in 70% of those cases. The same database was then used to assess nonsurgical paresthesia reports from 1999 to 2008 inclusive, to see if the findings were consistent with those from 1973 to 1998. Once again, the observed frequencies for the reporting of paresthesia were greater than expected for both articaine and prilocaine ( $\chi^2$ ,  $p < 0.01$ ), and the tongue was the most common structured affected, involving 79.1% of the reports. This was then followed by an assessment of the United States Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System computerized information database. Nonsurgical paresthesias reported following local anesthesia administration from 1997 to 2008 were evaluated. During the study period 248 cases of paresthesia following dental procedures were reported. The lingual nerve was affected in 89.0% of cases. Reports involving 4% prilocaine and 4% articaine were 7.4-times and 3.6-times, respectively, greater than expected ( $\chi^2$ ,  $p < 0.0001$ ) based on local anesthetic usage by U.S. dentists. This was then followed by a similar study of adverse events in the United Kingdom. This also found that the frequency of observed paresthesia associated with articaine was 5.9 times greater than expected ( $\chi^2$ ,  $p < 0.0001$ ). In the U.K. articaine is a 4% solution but prilocaine is primarily a 3% solution. In conclusion, the data from all of these studies suggest that post-injection paresthesia following a mandibular block is more likely if a 4% solution, namely either prilocaine or articaine, has been administered.

ML-2

The effect of CXCR4 over-expression on the cell proliferation and Invasion of oral squamous cell carcinoma cells  
Jae il Lee  
Dept. of Oral Pathol., Sch. of Dent.,  
Seoul National Univ.

ML-3

Exploring functional tissue-organ from human embryonic stem cells  
Tong Cao  
National Univ. Health System and  
National Univ. of Singapore

The oral squamous cell carcinoma (OSCC) accounts for approximately 90% of oral malignancies. Also, oral carcinogenesis is a multistep process and requires accumulation and interplay of a series of molecular events.

Chemokines, small (7~15 kDa) pro-inflammatory chemoattractant cytokines that bind to specific G-protein coupled seven-span transmembrane receptors (GPCRs) that present on the plasma membrane of target cells, are major attractants of different types of blood leukocytes to the sites of inflammation.

Among these chemokines and their receptors, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12)/CXCR4 axis has been demonstrated to be involved in the lymph node or distant metastasis of several types of cancer, including prostate cancer, kidney cancer, neuroblastoma, breast cancer, and melanoma. In addition, CXCR4 positive OSCC has significantly higher PCNA labeling index than CXCR4 negative OSCC.

According to our studies, CXCR4 expression was found to be significantly associated with lymph node metastasis, MMP-9 expression, and Ki-67 expression. We also had found that high expression of CXCR4 and MMP-9, along with size of tumor, clinical stage, and positive lymph node metastasis, were strongly associated with poorer survival. CXCR4 could be a valuable prognostic marker for OSCC. However, altered tumorigenicity by over-expressed CXCR4 in OSCC has been little known in *in vitro* and *in vivo* study. Down-regulation of CXCR4 by siRNA showed anti-proliferative and anti-invasive effects in OSCC cell lines *in vitro*. The over-expressed CXCR4 could effect on OSCC cell proliferation and their signaling cascade. CXCR4 might be a useful target molecule for the treatment of OSCC.

Government authorities, academies, research institutes and the industries of health, drug, food, cosmetics, chemicals and environment are presently hindered by a lack of functional, healthy and standardized human platforms of cells, tissues and organs, and predominantly use costly live animal models in addition to the cells of low clinical relevance. Existing models of live animals or on immortalized cell lines of either animal or human origin, often poorly reflect human physiology. Primary human cell cultures are difficult to procure in sufficient quantity and can be prone to much inter-batch variability, depending on the cell source. By contrast, self-renewable, genetically-healthy and single-sourced human embryonic stem cells (ESC) exhibit enhanced biological relevance and stable predictivity over its more expansive counterparts. As genuine pluripotent stem cells, human ESC serves as an unlimited source potential to develop into all cell types of human body. Hence, global pioneers and governments like EU and UK endeavour to develop a technically-simple, cost-effective and replicable system of human ESC derived live platforms in last decade. This fast development is revolutionizing health sciences from animal-based platforms to much more accurate human-based platforms. The revolution will bring a new burgeoning industry of ESC human platforms of live cells, tissues, organs and systems in next decades.

The US Congress and government have been encouraging 'promising human ESC R&D' through legislations, policies and guidelines since 2009. US initiated the clinical trials of human ESC therapies for eye diseases and spinal cord injury since 2011. Besides various human ESC progenies, functional tissues with multiple cell lineages, unique vascularisation and innervation by autologous human ESC progenies are currently being explored. The human ESC progenies, functional tissues and organs will offer ideal *in vitro* 'clinical' platforms of no-risk trials/tests for the basic, translational studies and



applications of all human health related sciences including fundamental study of health, ageing, disease, prevention, diagnosis, therapy and transplant; drug and med-tech R&D. Moreover, those standardized *in vitro* human live platforms of no-risk trials/tests will be widely adopted in much more areas beyond medicine and pharmaceuticals. The major other applications will be the human function and safety evaluation of food; cosmetic; daily and general chemicals; organisms; nuclear, IT, communication, electromagnetic, radiating device and technique; environment (air, water, soil, daily living and working environment); other human-contact substance, products and techniques. The platforms of human ESC progenies, functional tissues and organs will be ethically and gradually used at reasonable and practical pace, non-clinically, pre-clinically and clinically in all health related industries, academies and authorities.

DS-1

Towards gender equality in academia  
Irma Thesleff  
Inst. of Biotechnol., Univ. of Helsinki

Scientific research and universities have historically been dominated by men, but during the last 100 years the opportunities of women to develop academic careers have improved significantly. This progress has varied dramatically between different countries, and has been largely linked with the political equality of genders. My home country, Finland, is an example of a society where men and women of all social classes have been politically equal for a long time. (In fact, Finland was the first country where women were granted the right to stand for parliamentary election –in 1906). Consequently, it has been common in Finland that women work outside home: already in the 1980's women made up 48% of the work force. However, they earned just two thirds of men's salaries. Women had lower positions, and for example men worked as supervisors or managers. Although women's salaries have proportionally increased since the 1980's, they still lag behind those of males. This holds true also in universities, where women commonly have lower positions.

Despite the long history of equal opportunities in Finland –and the fact that the first female professor was nominated already in 1927, and that more than 50% of university students have been female since early 1980's– less than 25% of the university full professors are presently women (though this is one of the highest figures in the world). A remarkable example is the gender of professors in dentistry: I was the first female professor in dentistry at the University of Helsinki, although 70% of dentists have been female since the first decades of the 20th century! The reasons for the underrepresentation of female scientists in the higher university positions is being actively discussed throughout the world, and innumerable committees have suggested measures whereby the careers of female scientists could be supported.

I will tell about my experiences as a woman scientist over several decades: for example the challenges in convincing male colleagues that a female scientist can be equally good as a male and that she should be taken seriously, and the struggle

in finding a balance between work and a family (including three children and a husband), and the acceptance of the fact that there is never enough time. Although being a woman in science has sometimes been challenging, it has also presented special opportunities during the last two decades when the gender equality has been raised as an important issue. I am happy to discuss gender equality with the audience after the talk and tell more about my own career development.

DS-2

日本の学術分野での男女共同参画の現状

山本 照子

東北大 院歯 顎口腔矯正

In 1999, The Basic Act for a Gender-Equal Society was established in Japan, which was set as “one of the most important theme of our country in the 21st century”. In the social and economic major break, such as the advent of Japan’s aging society and decline birthrate, the progress of the knowledge based society, globalization and intensity global competition, the progresses of the society vibrant with life made by men and women demonstrating their individuality and abilities are our most important theme. Until now, the comprehensive solution for these problems has been considered, however, their administrative and social system is far from being satisfactory.

It is even more pronounced in the field of science and technology, where the percentage of female scientist in Japan is lowest among developed countries. The Japanese government recognized the importance of increasing the participation of women in the science, technology, engineering and mathematics workforce. I will briefly talk about the present situation of gender equality in Academia of Japan and discuss this issue with the audience.

CS-1

インクレチン療法の期待と課題  
清野 裕  
関西電力病院

CS-2

歯周病と糖尿病の関連性からひもとく  
Oral-Systemic Medicine の分子基盤  
西村 英紀  
九大 院歯 歯周病

WHO の推計によると、わが国を含むアジアでは今後 20 年間に、特に若年者を含めて 2 型糖尿病患者の爆発的な増加が予想されており、その対策が急がれている。アジア人は、欧米人とは明らかに異なり、インスリン初期分泌が弱いことから、少しの体重増加でも容易に糖尿病を発症する。このようなアジア人 2 型糖尿病の病態の特徴であるインスリン分泌不全に対応し、良好な血糖コントロールを維持するためには、現状の薬物治療では低血糖、体重増加、膵β細胞量の減少を抑止できない。

インクレチンは食事摂取に伴い消化管から分泌され、血糖上昇に応じて膵β細胞からのインスリン分泌を増強する。GLP-1 についてはα細胞からのグルカゴン分泌も抑制することで、血糖の恒常性を維持する。インクレチンシグナルは、食事摂取によって血糖値が上昇しようとする前に、消化管が炭水化物の摂取量をセンサーとして感知し必要なインクレチンを分泌し、グルコースによるインスリン分泌を増強することによって、血糖値を一定以上に上げない仕組みである。

2 型糖尿病ではグルコースによるインスリン分泌機構だけでなく、インクレチンのインスリン分泌増強効果も破綻する。その原因としては、インクレチン分泌は 2 型糖尿病でも変化が認められないことから、受容体レベルあるいは受容体以降のシグナル伝達に障害が存在する可能性が示唆されている。ただし 2 つのインクレチンの内、GLP-1 については比較的作用が保持されているため、2 型糖尿病治療への応用は GLP-1 の作用を増強する戦略をとることとなった。インクレチン効果の増強には薬剤のみならず食べる食品、食べる順番などが大きく影響するため、咀嚼に必要な歯の管理は極めて重要である。

米国ピマインディアンを対象として、歯周病治療で糖尿病の血糖コントロールが改善するとした報告(1997 年)を端緒として、数々の追試験が行われてきた。この間、エビデンスの蓄積とともに日本歯周病学会のガイドライン(2008 年発行)で推奨度(C1)(根拠は明確でないが、コンセンサスがある)であったものが、糖尿病学会のガイドライン(2010 年発行)では推奨度(B)(歯周病治療を勧める)にまでグレードアップした。私どもは最近、日本人 2 型糖尿病患者を対象とした介入試験(ヒロシマスタディ)で、炎症マーカー(高感度 CRP)の上昇した 2 型糖尿病患者に抗菌剤を併用した歯周治療を行うことで、ヘモグロビン A1c が未治療の場合に比べ有意に改善することを報告した。すなわち、この場合の Oral-systemic medicine の間を取り持つ基盤は軽微な炎症ということになる。

高感度 CRP の上昇に代表される軽微な炎症は、膵臓からのインスリン分泌能よりもむしろインスリン抵抗性と関連することが国内外で示されている。先のヒロシマスタディを詳細に解析したところ、同じ歯周病を有していても炎症マーカーが上昇している被験者は炎症マーカー低値の被験者に比べ、有意に体格指数が上昇していることが判明した。すなわち、重度の歯周病で炎症マーカーが上昇しやすい 2 型糖尿病患者は、そうでない患者に比べより内臓脂肪が成熟しているものと考えられた。一方、成熟内臓脂肪に多数の炎症性細胞浸潤が観察されること、免疫細胞と脂肪細胞の相互作用により脂肪細胞由来生理活性物質(アディポカイン)の産生性が著しく亢進することが報告されたことを受け、内臓脂肪の成熟は一種の自然免疫の亢進状態であると考えられるようになった。

以上の背景からここでは、歯周病感染-免疫細胞の活性化-内臓脂肪での炎症反応の亢進-インスリン抵抗性を基軸とした Oral-systemic medicine に対するわれわれの仮説を紹介し、分子基盤解明の一助としたいと考えている。

CS-3

生命を支えている臓器としての骨組織  
—歯周疾患と骨粗鬆症の関連—  
宇田川信之  
松歯大 口腔生化

KS-1

生体蛍光イメージング技術が拓く次世代骨研究戦略  
今村 健志  
愛媛大 院医 分子病態医学

時に生命の危機を惹起する血液中のカルシウム濃度の変動を調節している最も重要な器官は骨である。骨は、我々の体を支え運動機能を担当しているのみならず、生命を維持するための臓器として絶えず動的に活動している。

骨吸収と骨形成が絶え間なく繰り返されることにより、古い骨が新しい骨に置換されていく過程でカルシウム濃度は調節されている。この骨吸収と骨形成は、動的平衡の状態に保たれたカップリング現象を示す。しかし、様々な全身的要因により骨吸収が骨形成を凌駕すると、骨粗鬆症を発症することとなる。

高齢者における歯の喪失は、歯周疾患による歯槽骨吸収が大きな原因を占めるが、骨粗鬆症との関連は今まで詳しく語られてこなかった。歯の喪失は、発音機能や咀嚼機能の低下を招き、全身の栄養状態やQOLの低下につながることで、高齢化社会の到来と共に問題となっている。

骨芽細胞由来の破骨細胞分化因子であるRANKLの発見(1997年)から15年経過した。現在では、RANKL中和抗体が骨粗鬆症の治療薬として臨床応用されるに至った。一方、RANKLのデコイ受容体であるOPG遺伝子欠損マウスとRANKLの高発現マウスは、共に骨粗鬆症となる。これらの骨粗鬆症マウスを用いた実験結果から、骨細胞が産生するOPGが皮質骨や歯槽骨の維持に重要な役割を果たしていることが、OPGの新しい機能として注目されてきている。また、OPGの発現低下が歯周疾患の進行に影響を与えることを示す実験結果も集積してきた。

今回のシンポジウムにおいては、骨粗鬆症と歯周疾患との関連に焦点をあて、生命を支えている臓器としての骨組織の役割について、われわれの実験結果を中心に講演したい。

近年、科学の進歩、特にオミクス技術や遺伝子改変マウス技術の台頭により、骨研究分野においてもさまざまな分子の役割やその作用メカニズムが明らかにされつつある。しかし、骨組織が生体深部に存在する硬組織であるために、骨に存在する重要な細胞や分子が、生体の中でどのようにダイナミックに機能しているかを明らかにすることは難しい。それを克服するためには、動物が生きた状態で細胞や生体分子をリアルタイムに可視化できる生体蛍光イメージング技術の発展が必須である。近年、分子生物学の進歩による新しい蛍光タンパク質の発見と改良、蛍光有機小分子を用いた蛍光プローブ作製技術の進歩、さらにレーザーや蛍光検出器などの光学機器の性能の飛躍的向上などにより、細胞のシグナル伝達から細胞周期までライブでイメージングすることが可能になり、発生学、神経科学からがん研究に至る幅広い生命科学分野で光イメージング技術が活用されている。一方で、骨の光学的特性、特に散乱の問題などから、骨の生体蛍光イメージングの問題も浮き彫りになっている。

そこで、本発表では、骨組織の生体蛍光イメージングの現状と問題点を洗い出し、次世代の骨研究における生体蛍光イメージングの課題と可能性について議論したい。具体的には、さまざまな蛍光プローブを駆使した生体イメージングの実例を紹介し、蛍光イメージングの可能性を探る。一方で、骨組織の生体蛍光イメージングについて、さまざま蛍光イメージング法におけるデータを比較しながら、その問題点を洗い出す。最後に、その問題点解決の手段の一つとして、われわれが開発している新規補償光学型長波長2光子励起顕微鏡を紹介し、非線形光学を駆使した骨イメージングの可能性と将来像を考える。



KS-2

骨細胞のバイオイメーキングとナノモデル解析  
上岡 寛  
岡大 院医歯薬 歯科矯正

近年、骨細胞に対する様々なアプローチがなされ、骨細胞はメカニカルセンサーとして骨リモデリングの統括を担う細胞として注目されるようになってきた。しかしながら、どのような機械的刺激がこの細胞を活性化させるのかはいまだ明らかにされていない。その大きな壁として、骨細胞周囲の骨基質の存在がある。単離骨細胞を用いた *in vitro* の実験では、骨細胞に機械的刺激を介在すると考えられている周囲骨基質が不在の状態となり、機械的刺激を負荷する実験様式に絶えず疑問が残る。*In vivo* の実験では、厚い骨基質が骨細胞を取り囲むことにより生きた細胞の動態を解析することを妨げていた。そこで近年、生体工学的な試みにより、様々な骨細胞への機械的刺激様式が提案された。その一つに、骨細胞突起と骨細管に挟まれた空間に存在する体液の流れが骨細胞の機械的刺激への応答を引き起こす、すなわち、流体剪断応力がある。そこで、我々は3 MV 超高压電子顕微鏡(阪大超高压電子顕微鏡センター)ならびに電子トモグラフィ法から骨細胞突起と骨細管のナノレベル立体構築を行い、その中で流れのシミュレーション解析を試み、骨細胞にどのような刺激が与えられているのかを検討した。その結果、骨細胞突起および周囲骨基質の微細構造に応じた特徴的な流れが確認された。しかしながら、超高压電子顕微鏡での観察は、数 $\mu\text{m}$ 厚の切片での観察であるために、細胞の一部の観察しかできなかった。そこで、最近開発された直交配置型 FIB-SEM(物質・材料研究機構)を用いて、アルゴンイオンビームで骨表面を50 nm ピッチで連続的に切削し、その表面(25 $\mu\text{m}$ 平方)をSEMで観察した。この連続断面画像をもとに、骨細胞ならびに周囲骨基質を広範囲に、しかも高詳細に三次元構築できた。このナノレベルの解像度をもつ立体構築モデルをもとに今後、より詳細な骨組織中の力学シミュレーションの可能性が示唆された。

KS-3

イメージングを駆使した歯の発生の新たな理解への挑戦  
原田 英光、大津 圭史、藤原 尚樹、  
坂野 深香  
岩医大 解剖 発生再生

歯の発生は、免疫組織化学を含めた形態学と、遺伝子改変マウスによる分子発生生物学を両輪とした研究手法の発展によって、形態形成に関わる数多くの分子とその機能が解明され、その成果は歯に異常を生じる先天性疾患の病因の究明や再生医療のツールとして応用されるまでになった。しかし、歯の形態や歯根形成を制御している分子が同定されても、それらの分子機能が咬頭形成を担う細胞動態にどのように関わってくるのか、歯根の発生時に観察される Herwig 上皮鞘は cervical loop 細胞のどのような変化で形成されるのか、エナメル質や象牙質の石灰化と血管網構築の関係など、形態形成の総合的理解においていまだ釈然としない点が数多くみられる。これらの事象を理解する上で課題となる問題点は、2D のイメージから 3D の形態を理解する困難さ、細胞培養と生体での現象のギャップを埋める研究、分子機能の異常とそれがもたらすフェノタイプとの間を関連づける細胞生物学的研究の欠如などが上げられる。最近、優れた蛍光、発光プローブの開発や顕微鏡の発達によって、細胞、組織、個体を様々な視点から観察するイメージング技術が開発されてきた。このような研究背景のもと、本講演では従来我々が行ってきた歯の発生研究をベースに、歯の発生のメカニズムをさらに詳細に理解できるように取り組んできた細胞、組織、器官レベルでのイメージング技術を紹介する。この技術によって、従来の結果と異なる点、従来の研究成果を再確認できた点、新しい発見につながった点などを整理しながら、エナメル上皮幹細胞の挙動、中間層細胞の発生のメカニズム、歯根発生におけるヘルトヴィッチ上皮鞘形成過程、エナメル質の横紋形成メカニズムに関する結果などを報告する。また、これらの技術を応用した将来的な研究と、今後の歯の発生研究で求められる研究とは何かについて議論したい。



KS-4

唾液分泌シグナル応答の intravital イメージングと分泌制御機構の解析  
根津 顕弘、森田 貴雄、谷村 明彦  
北医大 歯 薬理

唾液腺における水・電解質分泌は、受容体刺激を介した腺房細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  応答によって調節されている。これまでのライブイメージングを使った研究により、唾液腺細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  ウェーブや  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションなどが明らかにされてきた。これらの  $\text{Ca}^{2+}$  応答の時間・空間的变化と、唾液腺の水・電解質分泌やその他の機能との関係を解明する手段として、これまでの *in vitro* 系を使った解析には限界がある。実際の唾液分泌の調節では、腺房細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  応答に加え、唾液腺の血流量や神経系を介した調節などが関与する。このような生体で起こる臓器の応答や生理機構を明らかにする実験系として、生きた動物を使った intravital イメージングが注目されている。

最近、蛍光タンパク質遺伝子を使った様々なタイプの  $\text{Ca}^{2+}$  バイオセンサーが開発されてきた。われわれはラット顎下腺開口部から逆行性にアデノウイルスベクターを注入し、非侵襲的に腺房細胞に蛍光タンパク質を発現させる実験系を確立した。この方法を使って、顎下腺腺房細胞に G-GECO や YC-Nano50 といった  $\text{Ca}^{2+}$  センサーを発現させ、薬物刺激や神経刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  応答の intravital イメージング解析を行っている。特に現在は、唾液腺の  $\text{Ca}^{2+}$  応答や血流動態と唾液分泌の関係を明らかにするために、マクロズーム蛍光顕微鏡を用いた顎下腺全体の  $\text{Ca}^{2+}$  応答と同時に、二次元レーザー血流計を用いた血流イメージング解析、あるいは微小ファイバー圧力計を使った唾液分泌のリアルタイム解析を行っている。この解析ではアセチルコリンの静脈投与によって、投与速度に依存した顎下腺の  $\text{Ca}^{2+}$  応答と同時に、一過性あるいは周期的な血流増加が観察されている。これらの血流変動における交感神経系の関与や、唾液分泌速度への影響を示唆する結果が得られている。さらに我々は、舌神経刺激によって反射性に副交感神経が活性化する反応を利用して、神経刺激による顎下腺の  $\text{Ca}^{2+}$  応答を解析している。このような神経刺激は、薬物刺激とは異なるパターンの  $\text{Ca}^{2+}$  応答を起す可能性が考えられる。これらの解析結果に加え、共焦点レーザー顕微鏡を使った細胞レベルでの intravital イメージングの結果を紹介し、生体で起こる唾液分泌制御機構について考察したい。

KS-5

蛍光から化学発光へ—バイオイメージングの新潮流—  
永井 健治  
阪大 産研 生体分子機能科学、JST  
さきがけ

蛍光タンパク質は生物学研究に革命をもたらしたことは論を待たない。今や生物学研究のみならず、医学、薬学、さらには物理学分野でも用いられる日常的なツールになった。蛍光タンパク質を用いたバイオイメージングにより様々な現象が発見され生命の理解に大いに貢献している。近年では 100 nm 以下の空間分解能を達成する超解像にも不可欠になり、活躍の場に事欠かない。このように蛍光タンパク質は極めて有用で強力なツールではあるが、欠点が無い訳ではない。蛍光観察に必須の励起光照射が、時に細胞環境をかく乱し、あるいは組織深部の観察を困難にしてしまうからである。

そこで我々が目を付けたのが、励起光照射を必要としない化学発光である。しかしながら、化学発光のシグナルは非常に微弱なため、シグナルの検出は数分から数時間という長時間の露光が必要であるという問題点を有していた。この問題を解決するために、我々は改変型ウミシイタケ luciferase と Venus 蛍光タンパク質を高効率にフェルスター共鳴エネルギー移動が生じるように融合し、大幅に発光強度を増加させることに成功した。Nano-lantern と名付けられたこの化学発光タンパク質により、生きた細胞を蛍光と同程度のクオリティで観察することが可能になっただけでなく、自由に動き回る脱毛していないマウス体内の腫瘍組織を高感度に実時間観察することが可能になった。また、Nano-lantern を基に、 $\text{Ca}^{2+}$ 、ATP、cAMP を検出可能なセンサーを開発し、蛍光センサーが使用できない環境下において、これらの生理活性物質の動態をイメージングすることに成功した。これら励起光を必要としない化学発光性のセンサーにより、オプトジェネティクスにより細胞機能を光操作しながらのバイオイメージングも可能になった。

本シンポジウムでは、我々の研究室で生み出されてきた蛍光タンパク質や化学発光タンパク質を紹介し、合わせて今後のバイオイメージングの展望を述べたい。

MS1-1

発生物学的アプローチによる口腔器官の再生  
辻 孝  
東理大 総合研究機構

MS1-2

ゲル材料を使った *in vitro* での腺組織形態形成制御  
松本 卓也  
岡大 院医歯薬 生体材料

口腔は歯や唾液腺、舌など複数の器官からなり、食物の摂取や発音、味覚などの多様な機能により健康や生活に大きな役割を果たしている。そのため疾患や傷害によるこれら器官機能の低下や喪失は生活の質を大きく低下させることから、材料工学や薬物などによる治療が長らく試みられてきた。最近になり、再生医療技術が開発され、「幹細胞移入療法」や「細胞シート工学技術」が様々な医療分野で応用され、歯科領域においても歯髄や歯周病など口腔器官の組織再生の研究が進められている。さらに次世代再生医療である「器官再生医療」の研究開発が進められている。その器官再生の戦略として、胎児期の上皮・間葉相互作用によって誘導される「器官原基」を再生する、発生物学的なアプローチによる器官再生が成果を上げつつある。

私たちは、単一化上皮性・間葉性幹細胞から器官原基を再生する「器官原基法」を開発し (*Nature Methods* 4, 227-230, 2007)、口腔に関連する歯や唾液腺の器官再生に取り組んできた。歯の再生では、再生歯胚を成体の歯の喪失部位へ移植することにより再生歯が萌出、咬合し、歯根膜や神経機能も再生することを明らかにした (*PNAS* 106, 13475-13480, 2009)。さらに歯と歯根膜、歯槽骨を有する再生歯ユニットを移植すると、骨性結合により生着し、即時機能型の歯の再生が可能であることを明らかにした (*PLoS ONE* 6, e21531, 2011)。一方、唾液腺の再生では、唾液腺全摘出マウスに再生唾液腺原基を導管接続し、再生唾液を口腔内へ分泌させ、唾液腺摘出に伴う口腔内の洗浄や嚥下障害を機能的に回復可能であることを明らかにした (投稿中, 2013)。また成体毛包に存在する幹細胞から機能的な毛包器官再生が実証されたことから (*Nature Commun.* 3, 784, 2012, *Sci. Rep.* 2, 424, 2012)、器官再生医療の実現可能性が高まったと考えられる。本講演では、幹細胞の精密操作による発生物学的アプローチによる器官再生の研究戦略と進展について紹介し、その現状と課題を考察したい。

近年の生体材料学、組織工学の発達により、細胞や生体組織に親和性の高い材料の開発が加速されている。これら材料に生命科学研究から得られる最新の知見を融合することで、これまでにない新しい細胞/組織操作技術の創製、さらには新しい組織再生方法や新しい生命科学研究技術の確立につながる。

我々はこれまで、ボトムアップアプローチによる *in vitro* での生体組織生成 (生体組織合成) を究極の目標に研究を進めている。この目標に向けたアプローチとして、生体材料を使用した細胞周囲環境の整備を提案している。最近の研究から、「堅さ」という物理的因子が細胞の分化や増殖など細胞機能に重要な影響を及ぼすことがわかってきた。そこで、生体組織の堅さを再現できるゲル材料を元に *in vitro* の培養系を構築し、E12に摘出したマウス顎下腺組織の器官培養を行った。その結果、興味深いことに唾液腺組織の成長は柔らかいほど進み、堅いほど抑えられることが明らかとなった。このような現象は唾液腺以外にも歯や骨などの組織においても生じることを確認している。唾液腺での現象に関してそのメカニズムを検討したところ、周囲堅さ環境に依存した唾液腺組織における FGF7/10 などの増殖因子発現変化や、神経組織の成長変化などが重要な役割を担うことが明らかとなった。また、物理的環境ではなく、化学的環境に着目した実験系では、細胞接着機能を有する機能性ペプチド固定化ゲルを作製している。このゲルを用いた培養系は唾液腺成長促進に有効であることも確認している。

人工材料は成形、加工が容易であり、その形状、物性制御により用途も多様である。このような工学的手法との融合により、*in vitro* での唾液腺組織生成、制御、新規治療に向けた新しい方法論の確立が期待される。

MS1-3

抗体アレイによる幹細胞集団のキャラクタリゼーション  
加藤 功一  
広大院医歯薬保 生体材料

MS1-4

iPS細胞を用いたスキヤフォールドフリー骨組織再生  
江草 宏  
阪大院歯 補綴1

幹細胞を利用した再生治療は、歯周組織をはじめとする様々な組織や臓器を再構築するための手段として期待されている。しかしながら、この新しい治療技術を一般医療として普及させるには、さらに多くの工学的技術が確立されなくてはならない。とくに、体外操作を経て作製される移植用細胞の品質を管理するための技術の確立は、現段階から取り組んでおくべき重要な課題である。そこで本講演では、我々が取り組んできた細胞品質管理技術の開発について紹介し、バイオデバイス研究の果たす役割について議論したい。

これまで、移植細胞の特性化を目的として、形態異常、核型の変化、細菌等のコンタミネーションの有無など、様々な検査項目が提案されてきた。しかし、細胞集団の均一性を評価する方法は十分に確立されているとはいえない。そこで我々は、細胞集団における表面マーカーの発現パターンに注目し、迅速なアッセイによって多種類の表面マーカーの発現度合いを一挙に分析するための抗体アレイの開発に取り組んできた。

抗体アレイの作製には微細加工技術を利用することができる。これによって、小さなガラス基板上に表面マーカーに対する多種類の抗体を配列固定した。この抗体アレイ上で細胞の結合アッセイを行うことによって、表面マーカーの発現パターンを一挙に調べることが可能であることを白血病細胞株や神経幹細胞を用いて示してきた。さらに、歯科領域において応用が期待されている間葉系幹細胞に本手法を適用した結果、体外で培養された細胞集団を定量的かつ迅速にタイピングすることが可能であった。

一方、抗体アレイ上に結合した細胞の定量的計測法は、分析の高速化にとって重要である。我々は、表面プラズモン共鳴イメージング法を利用して、抗体アレイ上の細胞密度を染色や洗浄の操作を経ることなく2次元情報として取得する方法を確立した。この方法を用いれば、細胞と複数の抗体との反応性を瞬時にパラレル計測することが可能である。

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、癌遺伝子 c-Myc あるいはウイルスベクターを用いることなく、容易に iPS 細胞が樹立可能であることを明らかにしている。

iPS細胞は、その万能な分化能および無限の増殖能ゆえに、Bioengineering を駆使した3次元形状の細胞組織構造体の構築に好適な幹細胞源として期待されている。また、iPS細胞を用いた歯槽骨再生医療を実現するためには、iPS細胞を移植した先で腫瘍化させることなく骨組織の再生へと確実に導く技術の確立が重要である。我々はこれまでに、歯肉から樹立したマウス iPS 細胞を、ハイドロキシアパタイトの結晶構造を呈する成熟した骨芽細胞へ分化誘導する培養方法を確立してきた。また、任意の形状を有する温度応答性ハイドロゲルの鋳型(モールド)を利用することで、スキヤフォールドを用いることなく、任意の3次元形状で石灰化を誘導したマウス iPS 細胞の構造体を試験管内で作製する技術を確立している。さらに、この技術に骨芽細胞分化促進作用/腫瘍形成抑制作用を併せもつ小分子化合物を用いることで、移植先で iPS 細胞の構造体を腫瘍化させることなく、スキヤフォールドフリーで立体的な骨形成を促すことに成功している。この基本技術は、自己細胞由来材料、細胞の分化制御、腫瘍化抑制、再生骨の形状制御の観点から従来の骨移植材にない優れた特性を有する可能性を秘めている。

本発表では、この技術内容を中心に、歯肉を細胞源とする iPS 細胞技術が “Biodental Engineering” の発展に資する可能性を概説し、今後の課題と将来の展望について考察したい。



MS2-1

ゲノム解析からみえてきた歯周病細菌  
の新たな側面

内藤真理子

長大 院医歯薬 口腔病原微生物

MS2-2

CRISPR による病原性細菌の生存と進  
化戦略

中川 一路

東医歯大 院医歯 細菌感染制御

次世代シーケンサーの普及が後押しする形となり、全ゲノム解析プロジェクトは近年急速に増加している。病原細菌を含む原核細胞生物では進行中を含めて2万件を超えた。歯周病細菌では主菌種の全てでゲノム解析プロジェクトが行われており、これまでに6菌種の全ゲノム配列が決定、公開されている。ところで、次世代シーケンサーの技術開発のスピードは速く、より高性能で簡便な機種の実用化が期待されている。また解読されたゲノム配列の遺伝子予測と生物学的注釈付与の作業も Web サービスの利用により容易になった。このような状況により、近い将来、微生物の全ゲノム配列解析はより身近な汎用実験手法になると考えられている。本講演ではゲノム解析が歯周病細菌の解析にどのように生かされたかを、我々が実際に行った歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株の全ゲノム配列決定を例として、それから得られた知見も含めて紹介する。*P. gingivalis* の株間のゲノム比較から、本菌では大規模かつ多数のゲノム構造の再構成が生じ、本菌の菌株間の性状の多様性形成に寄与していることが示唆された。このゲノムの再構成の大半には転移性遺伝因子が寄与していた。また、この転移性遺伝因子を介して口腔内や腸管内の細菌間で遺伝情報の伝達が起きていた。さらに近縁の菌種と *P. gingivalis* の全遺伝子の比較から、本菌の病原因子の分泌に関わる新たな分泌機構である Por 分泌機構を見出した。この Por 分泌機構は近縁の歯周病細菌にも存在することから、歯周病の病態と深く関わることが予測された。さて、全ゲノム配列の決定により新たに多くの遺伝子の存在が明らかとなったが、約40%が今も機能未知である。このことを踏まえ、今後の歯周病細菌のゲノム解析の留意点、課題等についても触れる。

細菌の進化において、ファージやプラスミドといった外来性遺伝子による遺伝子の伝播やゲノム再構成、種内の菌株間での組換えなどによる多様性制御が重要である。一方で、外来性遺伝子の細胞間移動抑制機構として近年 clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) が注目されている。多数の菌株の比較ゲノム解析が可能となった今、このような進化の痕跡をより詳細に検討することができる。本講演では、そのような観点から、現在の我々の研究を幾つかを紹介したい。

A 群レンサ球菌 (GAS) は多彩な病態を示し、多くの異なるファージの獲得によって病原性を変化させていると考えられている。一方で、ファージなどの外来性 DNA に対する防御機構である CRISPR が存在することから、プロファージが多く存在することには矛盾があると考えられる。そこで、GAS 70 株のゲノム情報を用い、多株ゲノム比較解析を行った。その結果、2種類ある CRISPR は、排除対象としている外来 DNA の種類が異なっていた。Pan-genome から、特定の遺伝子の有無によりクラスタリングしたところ、同じ CRISPR スペーサーを持つ株同士と CRISPR を有しない株同士が同じグループになっていること、そして株特有の遺伝子セットがファージに由来していることから、本菌の CRISPR にはファージを選択的に取込む働きがあると考えられ、CRISPR により取り込むファージを制御していることが示唆された。

また、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* では、ゲノム再構成と組換えを詳細に調べた。その結果、3株のドットプロットでゲノム再構成発生点に insertion sequence (IS) が高頻度に認められた。また、multilocus sequence typing 解析から60株のスプリット系統樹で網目構造が顕著であることから、本菌では菌体間での組換えも頻繁におきていることがわかった。さらに、60株で同定した全 CRISPR スペーサーのうち97%は、相同性検索で7種のデータベース内に相同配列は検出されなかった。一方、残り3%のうち6割以上は本菌のゲノム配列の一部と相同で、その多くが IS 上またはその近傍に位置していた。よって本菌の CRISPR は、菌体内 IS や他の *P. gingivalis* 菌体由来の DNA を標的として、IS 移動や外来 DNA 取込みを抑制していると考えられる。

MS2-3

メタボロミクスとインタラクトミクス  
が描き出す CCN2 の新たな機能  
久保田 聡、前田 彩、西田 崇、  
滝川 正春  
岡大 院医歯薬 口腔生化

CCN2 は、CCN ファミリーと呼ばれる一群のタンパク質の代表的メンバーであり、最近まで成長因子の 1 つと考えられていた。しかし近年の研究から、この分子が他の CCN ファミリーメンバー同様、成長因子のカテゴリーに収まり切らない特質を持つことが明らかになってきた。CCN2 は 4 つのモジュールが連結された構造を持ち、それぞれのモジュールを介し、実に様々な分子と相互作用を演ずる。例えばインテグリン、Trk A や FGFR などの細胞表面分子、BMP や FGF、VEGF などといった成長因子、そして FN、アグリカンやパルカンといった ECM 分子がこういった分子に含まれる。CCN2 は、これら分子を指揮することにより、微環境に応じて多様で、時として予想外な効果を発揮する。このタンパク質は、基本的に細胞外、特に ECM に分布するが、時として細胞核内に見出されるなど組織随所に現われ、そこでどのような分子に出会うかによって機能が大きく変わる。したがって共存分子群と CCN2 の相互作用を全体的に把握することが CCN2 の機能を理解する唯一の道である。

CCN2 は軟骨細胞において、分化と増殖をともに促進するが、これは細胞生物学的に考えれば受け入れ難い効果である。しかし最近我々は、代謝産物の網羅的定量を可能にしたメタボローム解析技術を応用することにより、これを可能にする意外な背景を明らかにしつつある。さらにそうして得た所見は、CCN2 が変形性関節症から関節軟骨を守る分子であることにも裏付けを与えることになった。隠された CCN2 の機能をさらに解明すべく、我々は CCN2 を核としたインタラクトーム、すなわち共存分子群との相互作用の全体像の描出を進めている。こちらはまだまだ発展途上だが、最近得られた所見につき紹介したい。

MS2-4

転写ネットワークによる内軟骨性骨形成の制御機構  
西村 理行  
阪大 院歯 生化

内軟骨性骨形成は、未分化間葉系細胞の凝集に始まり、軟骨細胞への分化・増殖、軟骨細胞の肥大化、軟骨基質の石灰化、軟骨組織への血管侵入、軟骨細胞のアポトーシスを経て、軟骨組織の骨組織への置換にて完結する、非常に複雑な生命現象である。この多段階に及ぶ内軟骨性骨形成過程は、連続的かつ緻密に制御されている。この調和した制御には、Sox9 ファミリー、Runx2 ファミリーならびに Osterix などの転写因子によるチューニングが深く関与していることが明らかにされている。

私たちは、完全長 cDNA を用いた発現クローニング法、Microarray 解析、超高速シークエンサー解析などを駆使して、内軟骨性骨形成過程における転写ネットワークシステムの役割を明らかにしてきた。また最近、Sox9 による軟骨形成過程におけるエピゲノム制御機構も明らかにしつつある。さらに私たちは、*in vivo* サンプルを用いた発現解析システムを開発し、内軟骨性骨形成に関与する転写因子群の同定と機能解析を展開している。

本シンポジウムでは、内軟骨性骨形成の制御に関わる転写ネットワークシステムと、その解明に効果的な遺伝子クローニング法について概説したい。また、その転写ネットワークシステムの破綻による疾患の発症についても紹介したい。



MS2-5

ゲノムワイド関連解析(GWAS)による正常眼圧緑内障特異的ゲノムマーカー同定とその意義

田代 啓

京府医大 院医 ゲノム医科

MS3-1

口腔顔面領域における異所性痛覚異常の中枢機構

岩田 幸一

日大 歯 生理

緑内障は現在日本の中途失明原因の第一位となっている疾患で、40歳以上の有病率約5%の大変頻度の高い疾患である。早期は自覚症状に乏しく、眼科の健診を受けるか、たまたま眼科受診で見つけてもらう以外には発見されないので89%の緑内障患者が気づいておらず未治療である。しかし、緑内障マーカーが同定されるならば、健康診断のついでに血液検査で、緑内障になりやすい体質かどうかを判明し、そこから眼科受診の動機ができ、緑内障の早期発見早期治療の道が開ける。我々の緑内障ゲノムワイド関連解析GWAS研究はそのような緑内障の早期発見、早期治療に貢献する研究である。

米国NCIのウインクラー博士らのAIDS進行制御SNP解析プロジェクトに参画して、演者が発見・命名したサイトカイン*SDF1* (Tashiro *et al. Science* 261 (5121):600-603, 1993.) 遺伝子上のSNP同定に至った共同研究 (Winkler *et al. Science* 279 (5349): 389-393, 1998.)の際、ウインクラー博士が20年間に亘って2800例のエイズ患者の細胞株樹立によってゲノムDNAを確保した上でSNP解析をしている姿を見て、責任をとりきる研究態度を学習した。同じ態度で京都府立医大眼科木下茂教授らと9年間努力をして、緑内障症例と陰性診断したコントロール例の合計で5100例あまりを細胞株化して前向き追跡しながら解析中である。新世代の1000Kチップを用いた緑内障GWAS解析結果論文発表 (Nakano *et al. PLoS ONE* 7(3): e33389, 2012) では、有病率3.5%の正常眼圧緑内障について、世界に先駆けて正しい結果を発表することができた。今回は、欧米から正しく評価されているわれわれの大有病率の多因子疾患のGWAS研究例について歯科基礎医学会の先生方にご説明させていただいて、ご評価・ご指導を願いたい。

三叉神経損傷や口腔顔面領域に炎症が起こると、損傷神経や炎症部位の支配領域を超えた広い領域に異所性の痛覚異常が引き起こされることがある。このような異所性痛覚異常は誤診や誤った治療の原因となることから、臨床的に大きな問題となっているが、その詳細なメカニズムに関しては不明な点が多く残されている。そこで、我々は口腔顔面領域における異所性痛覚異常の発症機構を明らかにするため、様々な動物モデルを作製して研究を進めてきた。

末梢神経損傷や末梢組織の炎症によって、一次求心神経に強い持続的な興奮が誘導される。このような過興奮が長期間にわたって持続すると、末梢神経系だけでなく中枢神経系のニューロンも感作され、ニューロンの興奮性はさらに亢進する。中枢神経系の過興奮は損傷神経の周辺部に存在するニューロンの活動性にも影響を及ぼし、損傷を受けていないニューロンや炎症部位を支配していないニューロンに対しても興奮性の増強を誘導する。ニューロンとニューロンの機能連絡はニューロンの興奮異常の拡大を引き起こすだけでなく、グリア細胞にも作用して広い領域に分布するニューロンの興奮性亢進をもたらす。最近我々は、下歯槽神経を切断すると三叉神経第2枝支配領域である口ひげ部に機械アロディニアが発症することを見出した。さらに、この異所性痛覚異常には、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) に存在する astroglia の強い活性化が関与することを報告した。また、三叉神経損傷後の早期には microglia も強く活性化され、顔面領域の広い領域に痛覚異常が発症することを見出した。このような結果から、口腔顔面領域に発症する異所性痛覚異常に対して astroglia や microglia の活性化が重要な働きを有する可能性が明らかになった。

本シンポジウムでは我々がこれまでに行ってきた研究結果を紹介し、口腔顔面領域の炎症および神経損傷に起因した異所性疼痛異常の発症機構について考察する。

MS3-2

口腔顔面の侵害受容機構と痛覚異常  
寺山 隆司、杉本 朋貞  
岡大 院医歯薬 口腔機能解剖

口腔顔面の感覚情報は、三叉神経の各分枝によって脳幹の三叉神経知覚核群に伝達される。三叉神経知覚核群は主知覚核と脊髄路核から構成され、脊髄路核はさらに吻側亜核、中位亜核、尾側亜核に区分される。このうち、最も尾側に位置する尾側亜核は三叉神経系における脊髄後角の相同部位で、三叉神経系の侵害情報は専ら尾側亜核において中継されると考えられてきた。しかし、三叉神経知覚核群のより吻側部も、口腔顔面の侵害受容伝達に関与する可能性を示す報告がなされている。一方、末梢神経の損傷によって損傷を受けた神経の中核投射部位で種々の変化が起こり、これらの変化が神経損傷後の痛覚異常に関与することが知られている。三叉神経系においては尾側亜核での変化と痛覚異常との関連を示唆する報告がなされているが、さらにこのような変化が尾側亜核に限らず知覚核群の吻側部でも起こっていることが示されている。われわれの最近の研究でも末梢神経の損傷によって尾側亜核だけでなく、主知覚核と吻側亜核でグリア細胞の活性化等の変化が認められるとともに、神経損傷後に尾側亜核と吻側亜核においてそれぞれ異なる興奮性の変化が起こることが明らかとなった。また、尾側亜核では神経損傷によって損傷を受けていない周囲の神経からの収斂投射が起こることが明らかとなり、このような変化が神経損傷後の痛覚異常に関与する可能性が示唆された。今回は、侵害受容伝達における三叉神経知覚核群の機能および末梢神経損傷によって起こる痛覚異常における三叉神経知覚核群の関与、特に尾側亜核と吻側亜核の関与について報告する。

MS3-3

慢性の口腔顔面痛の管理において歯科医師には何が求められるか  
今村 佳樹  
日大 歯 口腔診断

慢性痛では、しばしば明確な身体的他覚所見を伴っていないかたり他覚所見に比して痛みの訴えが説明できないほど強かったりする。このことから、慢性痛の病態は社会心理的な面から説明されることが多く、対応も主にこれに基づいて模索されてきた。一方で、慢性痛の病態を解明すべく基礎研究者の努力によって各種病態モデルが考案され、基礎研究が重ねられてきた。これらの研究を通し、痛みの慢性化には中枢・末梢神経の感作と可塑性が重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。臨床的にも1990年代から機能画像解析が活発に用いられるようになったことで、慢性痛における脳活動が研究されてきた。慢性の特発性口腔痛患者では、感覚野、運動野を含めた高次中枢における痛みの調整機構に変調が生じている可能性が示されている。すなわち、慢性の特発性口腔痛においては、末梢のみでなく、高次中枢を含めた治療の検討が重要であることを物語っている。また、心理ストレスが発症のトリガーとなることが指摘されているが、特発性口腔痛患者においては、血漿中のストレス関連ホルモンの濃度は、患者の受容しているストレスの程度とは相関がみられるものの、特発性口腔痛の有無とは相関がみられず、このことは、心理ストレスの強さは病態の維持に影響しないことを示唆している。一方で、痛みの遷延は、破滅的思考を有する患者において高率にみられることが知られており、破滅的思考を示す患者には特定の遺伝的傾向がみられることが明らかにされている。これらの事実からは、慢性痛に陥りやすい体質とトリガーとなる身体的精神的環境の変化(心理ストレスの強弱や感染等の免疫異常など)が相まって中枢神経系の変調をもたらすと考えられ、歯科医師はこれらの総合的な変化に対応することが求められる。

MS3-4

口腔顔面痛の疼痛伝達メカニズムと新規治療法の開発—知覚神経節細胞からの神経伝達物質遊離—

松香 芳三  
徳大 院 HBS 咬合管理

激的な疼痛を訴える神経障害性疼痛治療には、抗てんかん薬や抗うつ薬などを処方することが多いが、効果がみられなかったり、めまいなどの中枢性副作用のために継続服用不可能であったりすることも少なくない。そのため、神経障害性疼痛のメカニズム解明と副作用の少ない治療法の開発が望まれている。慢性疼痛モデルにおいて末梢知覚神経節では神経興奮と神経伝達物質の遊離が増加しており、シナプスは存在しないが、知覚ニューロン間での伝達物質を介した疼痛情報の伝達が報告されている。このように、神経障害性疼痛のメカニズムの一部が知覚神経節の興奮と異所性の神経伝達物質遊離の亢進であるならば、末梢知覚神経節における神経伝達物質の遊離を抑制することにより、中枢性副作用の少ない治療法につながる可能性がある。

実際にこれまで我々は、神経障害性疼痛モデルでは知覚神経節における神経伝達物質遊離が増加し、その遊離は神経節細胞から生じていることを報告してきた。また、最近の研究では末梢に投与した精製 A 型ボツリヌス毒素 (BoNT/A) が三叉神経節における神経伝達物質遊離を抑制するとともに、神経障害性疼痛行動反応を抑制することが明らかになった。さらに、蛍光標識した BoNT/A 重鎖を利用した実験では、BoNT/A 重鎖が synaptic vesicle protein 2 (SV2) 受容体を介してラット培養三叉神経節細胞内に取り込まれること、ラット頬髭部中央に皮内投与した BoNT/A 重鎖が三叉神経節細胞内に取り込まれること、この末梢皮内投与した BoNT/A 重鎖の三叉神経節への輸送に逆行性軸索輸送が関与する可能性が明らかになった。

これまでの研究成果を踏まえて、我々はボツリヌス毒素製剤による慢性疼痛患者への臨床応用に関する研究も現在展開中である。今回のシンポジウムでは以上のようなことを紹介したいと考えている。

SS1-1

骨格発生メカニズムの理解と骨・軟骨再生医療

大庭 伸介  
東大 院工 バイオエンジニアリング

骨と軟骨をつくる骨芽細胞と軟骨細胞は共通の前駆細胞から発生し、各系統への運命決定と分化カスケードにより形成される。この一連の過程を制御するマスター因子群がこれまでに明らかにされてきている。転写因子 Sox9 陽性の骨格系前駆細胞は、ヘッジホッグ (Hedgehog- Hh) シグナルの入力により転写因子 Runx2 陽性の骨芽細胞前駆細胞へと分化する。一方、Hh 刺激を受けない細胞は軟骨細胞への運命を選択すると考えられる。骨芽細胞分化の中期から後期においては、転写因子 Runx2、転写因子 Osterix、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が必須の因子であり、軟骨細胞においては転写因子 Sox9 のほか Runx2 がマスター制御因子としてはたらく。

演者らの研究グループは、骨軟骨運命決定機構に注目して、Hh シグナルが骨芽細胞分化を制御するメカニズムに関して報告してきた。現在は、転写ネットワークとエピジェネティクスの観点から幹細胞および骨芽細胞・軟骨細胞の理解を深めるべく、クロマチン免疫沈降シーケンス法と遺伝子発現プロファイリングを活用することで、幹細胞の多能性と初期分化、および骨格系細胞への分化にかかわる転写因子群とヒストン修飾因子のゲノムワイドな位置情報と機能 (遺伝子転写) に対する統合的な解析に取り組んでいる。また、骨発生や軟骨発生を制御するメカニズムに関する知見に基づいて、骨・軟骨形成性シグナルを活性化する低分子化合物に着目し、これらをリン酸カルシウムなどの生体材料や多能性幹細胞と組み合わせることで、低分子化合物による骨・軟骨再生法に関して研究を進めている。これらの研究成果を紹介しながら、基礎的知見の再生医療への応用について議論させていただければと考えている。



SS1-2

自己培養歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再建

岩田 隆紀

東女医大 先端生命医科研

近年、幹細胞生物学と組織工学を背景とした細胞治療の研究が歯周領域においても大学を中心に進められている。歯周病を歯周組織幹細胞疲弊症としてとらえ、生体に存在する幹細胞をバイオマテリアルとコンビネーションで移植する細胞治療である。我々は細胞ソースとしては患者自身の歯根膜幹細胞を想定し、研究を進めてきた。また、組織を再構築するためのアプローチとして「細胞シート工学」をコア技術として取り入れている。「細胞シート」は、温度変化によって培養皿表面の性質が親水性/疎水性に変化するインテリジェント培養皿「温度応答性培養皿」を用いて作製される。

東京女子医科大学では、小動物・大動物を用いて「歯根膜細胞シート」の実験室レベルでの安全性・有効性を確認し、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に合致した臨床研究として2011年1月に厚生労働大臣より臨床研究実施の承認を得た。具体的には患者自身の抜去歯から歯根膜幹細胞を抽出し、「細胞シート工学」を用いてシート状に回収された「自己培養歯根膜細胞シート」を歯周欠損の根面に移植する臨床研究を進めている。「細胞シート工学」を用いることで細胞を非破壊的に細胞外マトリックスとともに移植することが可能である。さらに細胞間相互作用を保持したまま移植することが可能であるため、移植した細胞が拡散することなく、歯根面に高次機能を保ったまま移植できるのが大きな利点であると考えられる。無菌的に細胞を培養出来る「細胞プロセッシングセンター」と呼ばれる特別な施設で作製された細胞シートは3層に重ね合わされ、郭清術の行われた歯周欠損の歯根面に設置される。さらに、骨欠損部にはβ-リン酸三カルシウム(オスフェリオン:オリンパス)を充填することで付着器官の再生を促す。現在までに6例の移植が終了し順調な経過を示しており、今後2年間で全10症例の臨床試験を完了する予定である。

SS1-3

性ホルモンによる骨代謝調節機構の新知見と骨再生医療への展開

今井 祐記

愛媛大 プロテオサイエンスセ 病態生理解析

超高齢化社会になりつつある本邦においては、健康長寿の獲得が必須であるといえる。中でも、骨粗鬆症による骨折は、寝たきり状態を惹起する要因の一つであることから、骨折予防を目的とした骨粗鬆症治療が重要といえる。骨粗鬆症の大多数は、閉経後女性に認められる閉経後骨粗鬆症であることから、女性ホルモン(エストロゲン)による骨量維持機構の解明が、閉経後骨粗鬆症病態の理解や治療応用に必須であるといえる。

エストロゲンは、核内受容体スーパーファミリーメンバーであるエストロゲン受容体(ER: Estrogen Receptor)と結合する。エストロゲンと結合したERは、標的遺伝子の転写を制御することで、エストロゲンの標的組織において、その作用を発揮する。エストロゲンの生体内作用を明らかにする目的で、ER遺伝子欠損マウスが作出されたが、全身的な内分泌機構の破綻を認めたため、骨組織におけるエストロゲン作用の解明は限定的であった。そこで、骨組織特異的ER遺伝子欠損マウスを作出したところ、破骨細胞特異的欠損マウスでは、破骨細胞の増加を伴う骨吸収の亢進による骨量減少を認めた。また、骨芽細胞特異的欠損マウスでは、限定的な骨量減少に留まる一方で、骨組織に存在する細胞の90%以上を占める骨細胞特異的ER欠損マウスでは、骨形成の低下に伴う骨量減少を認めた。

このように、女性ホルモンによる骨量制御機構は、複雑なネットワークを介してその恒常性維持に寄与していることが明らかになりつつある。継続的な吸収抑制性薬剤による骨粗鬆症治療においては、Atypical Femoral Fractureや顎骨壊死が有害事象として存在するが、性ホルモンによる骨代謝制御を応用することで、再生医療も含めた将来的な治療応用の可能性が期待される。

SS1-4

神経系による骨代謝制御  
竹田 秀  
東医歯大 医 細胞生理

従来、骨代謝調節の主役は、骨芽細胞や破骨細胞の分化や増殖を調節するサイトカイン、ホルモン等の液性因子であったが、その概念が今、大きく変革しつつある。心・腎関連などに代表されるように、臓器同士が互いの代謝の調節に関わり、さらにこの臓器間の連係（臓器間クロストーク）が個体全体での恒常性の維持においても重要であることが近年明らかになった。骨においても、骨と他の臓器との関連が注目されはじめた。

臨床的には古くから神経系と骨代謝の関連について、頭部外傷や脊髄損傷を合併する骨折例では骨折の治癒が早い場合があることなどが知られていた。近年、神経系や神経ペプチドの遺伝子改変マウスにおける骨代謝の解析を通じて、交感神経系をはじめとした神経系や食欲に関わる神経ペプチドの骨代謝における意義が分子レベルで解明されている。

さらに最近我々は、骨に投射する感覚神経系が骨の発生および再生に重要であることを見出した(Nature 2013)。我々は神経再生において注目されているセマフォリン 3A に注目し、研究を行った。まず、神経においてセマフォリン 3A を欠落したマウス（神経特異的セマフォリン 3A 欠損マウス）の骨組織を調べたところ、骨の細胞自体には異常がないにもかかわらず、骨密度が低下した骨粗鬆症様の病態を呈していた。さらなる解析により、正常のマウスでは骨に数多くの感覚神経が投射するが、神経特異的セマフォリン 3A 欠損マウスではその数が低下しており、そのために骨粗鬆症を発症したことが明らかとなった。さらに、神経特異的セマフォリン 3A 欠損マウスでは、骨の障害に対する再生能力が大きく低下していることが示された。

こうして、骨の発生、再生時に感覚神経系が骨に投射することが、健康な骨の発達や、怪我の後の骨の再生、治癒に重要であることが明らかになった。本講演では、我々の得た最近の知見を中心に、骨代謝における神経系の病態生理的意義について議論したい。

SS2-1

成熟骨芽細胞 MLO-A5 は Gap junction を介して未分化間葉系幹細胞 C3H10T1/2 の分化を制御する  
三上 剛和  
日大 歯 解剖 I

**【目的】** 骨芽細胞は、骨基質タンパクを生産する細胞であり、骨形成において主要な役割を果たす。しかし、近年、骨形成以外にも、その近傍に存在する破骨細胞や造血系幹細胞の維持や分化を制御する、いわば司令塔としての役割を担うことが報告されている。一方、骨髄には、骨芽細胞をはじめ、脂肪細胞や軟骨細胞などに分化する間葉系幹細胞が存在している。この間葉系幹細胞と骨芽細胞は互いに隣接して存在することから、両細胞間には何らかの相互作用が存在することが予想される。しかし、その詳細については不明である。そこで、本研究は、骨芽細胞と間葉系幹細胞の共培養系を用いて、骨芽細胞の司令塔としての役割について検討した。

**【方法】** マウス由来の培養細胞株である MLO-A5 と C3H10T1/2 は、それぞれ、成熟骨芽細胞と未分化間葉系幹細胞の特徴を持つ。そこで、GFP を恒常的に発現する C3H10T1/2 (10T-GFP) を樹立し、この細胞を MLO-A5 と共培養した。その後、FACS を用いて 10T-GFP を単離し、各種遺伝子の発現について解析した。また、MLO-A5 と 10T-GFP 間の接触様式について、パッチクランプ法を用いて電気生理学的な解析を行った。さらに、C3H10T1/2 は、BMP-2 を作用させると骨芽細胞と脂肪細胞のどちらにも分化することから、BMP-2 を添加した培地で、MLO-A5 と 10T-GFP を共培養し、骨芽細胞と脂肪細胞の分化パターンについて検討した。

**【結果】** MLO-A5 と共培養した 10T-GFP では、単独で培養した 10T-GFP と比較して、骨芽細胞分化の指標とされる Bone Sialoprotein (BSP) と Alkaline Phosphatase (ALP) の発現が顕著に増加した。また、BMP-2 を用いた共培養では、Oil red O 陽性を示す脂肪細胞は観察されず、脂肪細胞分化関連遺伝子の発現が抑制されていた。パッチクランプ法による解析では、共培養した MLO-A5 と 10T-GFP の間において、gap junction が存在することが示された。さらに、gap junction の形成阻害剤によって、共培養による BSP および ALP の発現誘導の抑制が確認できた。

**【結論】** 骨芽細胞 (MLO-A5) は間葉系幹細胞 (C3H10T1/2) と gap junction を介して、直接連絡し合うことによって、脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を誘導すると考えられる。



SS2-2

骨・軟骨形成過程におけるギャップ結合分子パネキシン3の機能解析

岩本 勉

徳大 院 HBS 小児歯

SS2-3

破骨細胞の分化を調節する免疫関連分子とその検出法

森本 景之

産医大 医 第2解剖

細胞-細胞間、細胞-細胞外基質間の相互作用は組織発生過程において重要な役割を果たす。上皮組織においては、主に細胞-細胞間結合が重要で、かつ細胞-細胞外基質間での相互作用においては、基底膜がその役割を担う。一方、間葉組織においては、主として、細胞を取り囲む細胞外基質との相互作用が、重要な機能を担っている。それらの破綻は組織活動を傷害し、生命予後にも大きな影響を与える程重要な役割を司っている。

これまで骨や歯といった硬組織や軟骨に限局したギャップ結合分子は明らかにされてこなかった。我々はバイオインフォティカル解析手法を用いて、これらの組織に特異的に発現するギャップ結合分子として、Pannexin3 (Panx3) を同定した。Panx3はギャップ結合分子パネキシンファミリーに属し、4回膜貫通型の膜タンパク質である。Panx3は象牙芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞に強く発現し、これらの細胞の増殖と分化に深く関わっていることが示唆された。実際、これらの細胞株においてPanx3の発現を抑制するとその分化が抑制されることが示された。Panx3はこれらの細胞膜上に発現し、細胞内のATPを排出するヘミチャネルとして、機能していることが明らかとなった。その結果、増殖や分化に関わるシグナル伝達経路に影響を与えていることが明らかとなってきた。

このようにPanx3は歯、骨、軟骨の分化において重要な役割を担っており、かつ組織特異性の高い分子であることから、骨系統疾患の標的分子として有効でないかと考え、現在、我々は骨系統疾患に対し、本分子をターゲットとした応用の試みを行っており、そのことについても考察する予定である。

Double-stranded RNA dependent protein kinase (PKR) はウイルス感染やインターフェロン等に応答し、細胞の防御機構に関与する免疫関連分子である。我々は、このPKRが骨芽細胞や軟骨芽細胞の分化を調節することを *in vitro* において明らかとしてきた。また、*in vivo* においてマウス骨組織のTRAP陽性を示す破骨細胞にPKRの発現を認めた。マクロファージの機能や分化へPKRが関与することが報告されているが、破骨細胞におけるPKRの関与については未だ不明である。そこで、破骨細胞分化誘導へのPKRの影響および、RANKLシグナルを細胞内へ伝えるTRAF6とPKRの相互作用を解析した。

PKR変異遺伝子を細胞株RAW264.7に導入し、変異型PKR安定発現細胞をクローニングした。PKR変異細胞をRANKLで刺激すると単核のTRAP陽性細胞は認められたが、TRAP陽性を示す大型の多核細胞はほとんど認められなかった。また、前破骨細胞融合関連分子やNF $\kappa$ Bの発現は低下し、STAT1の発現は増加していた。これらのことから、PKRの変異は、正常な破骨細胞の分化・成熟を阻害することが判った。そこで、分割蛍光BiFC法を用いて、RANKLシグナル伝達へのPKRの関与について、TRAF6との結合の観点より検討した。BiFC法は結合を調べたい2つの分子に2分割した蛍光タンパク質をそれぞれ付与し、両分子の結合に伴う蛍光タンパク質の再会合を利用し、タンパク質相互作用の有無を解析する方法である。BiFC法による解析の結果、PKRは細胞質でTRAF6と結合し、その結合にはPKRの特定ドメインが重要であることが明らかとなった。以上より、免疫関連分子であるPKRは、TRAF6との結合を通じて破骨細胞分化に関与する可能性が示唆された。本シンポジウムでは、骨組織の形態学的解析において我々の研究室で留意しているポイントについても、紹介させていただきたい。

SS2-4

骨代謝の概日リズムと時計遺伝子  
近藤 久貴  
愛院大 歯 薬理

生物には地球の自転周期と密接に関連した、約 24 時間周期の生体リズム（概日リズム）が備わっている。骨代謝にも概日リズムが認められるが、その分子機構は未だ解明されていない。哺乳類では概日リズムの中核は視交叉上核に存在し、24 時間周期で発現の増減を示す時計遺伝子により制御されると考えられている。興味深いことに時計遺伝子は中核のみならず、末梢組織にも発現しているが、その機能は十分には解明されていない。近年、我々は骨芽細胞にも時計遺伝子が発現しており、それが自律的に概日リズムを刻むこと、そして糖質コルチコイドや交感神経シグナルによって同期化されることを示した。破骨細胞についても同様の検討を行ったところ、交感神経系よりはむしろ、糖質コルチコイドが破骨細胞の時計遺伝子の同期化に重要であることを明らかにした。さらに、時計遺伝子のみならず、破骨細胞の機能や分化に関連する遺伝子にも概日リズムが存在することを明らかにした。そこで、概日リズム形成の分子メカニズムを解明するため、プロモーター解析と Chip アッセイを行ったところ、それぞれのプロモーター上に時計遺伝子が結合することを確認した。以上の結果は、破骨細胞に発現している時計遺伝子が、破骨細胞の機能や分化の概日リズムを形成していることを示唆している。次に、内因性の糖質コルチコイドの影響を調べるため、副腎摘出 (ADX) マウスの骨組織における遺伝子発現を解析したところ、正常マウスの骨組織で確認された一部の時計遺伝子と骨代謝関連遺伝子の概日リズムが ADX マウスでは消失していた。ADX マウスで消失した骨代謝関連遺伝子の概日リズムは、合成コルチコイドの投与により回復された。以上のことから、糖質コルチコイドが中核の時間情報を末梢骨芽細胞や破骨細胞へ伝達する因子としての役割を担い、さらに、これら末梢細胞の時計遺伝子が、骨代謝の概日リズムを形成していることを示した。

SS2-5

転写因子 NF- $\kappa$ B による骨形成調節機構について  
大澤 賢次  
九歯大 歯 分子情報生化

転写因子である nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) は、炎症の発症や進行、免疫細胞の分化や機能、癌などさまざまな生命現象に深く関与する。NF- $\kappa$ B の活性化機構には、Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) などの炎症性サイトカインにより活性化され、I $\kappa$ B キナーゼ (IKK)  $\beta$  による I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化と分解を伴う古典的経路と、CD40 リガンドや Lymphotoxin (LT)  $\beta$  などのリンパ節形成に関わるサイトカインによって NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) が活性化され、IKK $\alpha$  の活性化を介して NF- $\kappa$ B2 の p100 から p52 へのプロセシングが起こる非古典的経路が存在する。

これまでに我々は、NF- $\kappa$ B の古典的および非古典的活性化機構と BMP/Smad シグナルのクロストークを検討した。BMP は転写因子 Smad 依存性に骨形成促進などの生理活性を示すタンパクであるが、Smad シグナルの他に NF- $\kappa$ B も活性化し、NF- $\kappa$ B の古典的経路の重要な分子である p65 が Smad と相互作用することによって、Smad 依存性の BMP 活性を抑制することを明らかにした。また、NF- $\kappa$ B の非古典的経路で重要な NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK) 遺伝子に不活型変異をもつ aly/aly マウスでは、NF- $\kappa$ B2 の p100 から p52 へのプロセシングが阻害され、破骨細胞形成の抑制と骨形成の亢進が認められる。aly/aly マウス由来の骨芽細胞などを解析した結果、NF- $\kappa$ B2 のプロセシングで生じる p52 は BMP 受容体の量的減少を引き起こすことにより、BMP の効果を負に制御していることが明らかになった。これらの結果を基に、NF- $\kappa$ B の活性化を制御することによって BMP による骨形成を増強できるのではないかと考え、NF- $\kappa$ B の選択的阻害剤を BMP とともにマウスに移植したところ、BMP による骨形成が強力に促進された。以上より、BMP による骨再生における NF- $\kappa$ B の阻害をターゲットにした創薬の可能性が示唆された。

SS3-1

唾液分泌における大脳皮質咀嚼野の役割

前田 直人<sup>1)</sup>、松尾 龍二<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>岡大 院医歯薬 咬合・有床義歯補綴、<sup>2)</sup>岡大 院医歯薬 口腔生理

連続電気刺激によってリズムカルな顎運動を誘発する大脳皮質領域は皮質咀嚼野と呼ばれ、さまざまな動物で確認されている。ラットでは、電気刺激によってパターンの異なる顎運動を誘発する2つの皮質咀嚼野が存在する。そのうち第一次運動野に位置するA-areaは、電気刺激によって速いリズムで単純な上下方向の顎運動が生じる。また、島皮質腹側部に位置するP-areaは、電気刺激によって側方および前後方向に複雑な顎運動が生じる。大脳皮質咀嚼野は単に顎や舌のリズムカルな運動だけでなく、唾液分泌にも関与するいわゆる「咀嚼」の中核であるという概念が提唱されている。しかし、唾液分泌における大脳皮質咀嚼野の役割については未だ不明な点が多い。

咀嚼時の唾液分泌については、2つの神経機序の関与が考えられる。ひとつは下位脳に存在する反射回路である。すなわち除脳動物でも、味覚や口腔粘膜などの感覚が唾液分泌を誘発する。今一つは大脳皮質咀嚼野から下行性に唾液核に至る経路である。

上記の点を考慮して、麻酔下におけるラットの異なる2つの大脳皮質咀嚼野(A-areaとP-area)を電気刺激したときに生じる顎運動と唾液分泌を同時に記録した。その結果、1)唾液分泌はP-areaの刺激のみで誘発され、A-areaの刺激では誘発されなかった。2)動物を非動化してP-areaを刺激すると、顎運動が停止していても唾液分泌が誘発された。3)本実験条件下では口腔内に食物が無い状態であったが、P-area誘発性の唾液分泌量は無麻酔下で固形飼料を摂取中の唾液分泌量の約7割に達していた。以上の結果から、大脳皮質咀嚼野(P-area)は、顎や舌の運動だけでなく唾液分泌の制御にも大きく関与することが判明した。

SS3-2

口腔咽頭領域への化学刺激がもたらす嚥下機能の変調効果

中村 由紀

新大 院医歯 摂食・嚥下リハ

嚥下は口腔内に取り込まれた食物や飲料水を、咽頭・食道を経て胃に送り込む半自働運動である。この運動は、食物の移送のみならず、分泌物や微粒子等から上気道を守る防御機能も併せもつ。嚥下の神経制御は複雑で、脳幹の嚥下中枢、多くの脳神経、筋群間・両側間の階層的な一連の神経筋活動から成り立っており、神経生理学的にも動作学的にも興味が集められ、基礎的な研究が精力的に行われてきた。意識的に起こす嚥下を随意性嚥下といい、大脳皮質および皮質下の種々の部位からの入力が必要な役割を担っている。一方、末梢の嚥下誘発領域への適刺激によって反射性に起きる嚥下を反射性嚥下といい、咽頭や喉頭粘膜の感覚受容器からの末梢性感覚入力が延髄の嚥下中枢の神経細胞に収束することによって引き起こされる。後者については、これまでも動物やヒトを対象として様々な知見が得られており、上喉頭神経や咽頭神経叢への電気刺激、またはその支配領域への機械刺激や化学刺激などが嚥下誘発に有効であることが報告されている。一方、口腔または三叉神経領域への刺激のみでは嚥下反射の誘発は難しいとされているが、感覚刺激が嚥下運動に変調をもたらすことも示唆されている。

我々は、ヒトの口腔もしくは咽頭領域へ経口的に挿入した極細のシリコンチューブを介して各種条件で溶液注入し、嚥下運動の記録解析を行った。本研究手法において用いた感覚刺激様式は、口腔や咽頭領域の限局部位に極微量の溶液を注入しているため、溶液内容に依存した化学刺激単独の効果をより明確に評価することが可能となった。その結果、咽頭への水(蒸留水)刺激が嚥下誘発促進に寄与していること、溶液別に比較すると嚥下誘発への効果に差があることが明らかとなった。また、刺激領域を比較しても、口腔と咽頭では変調効果の様式に違いを認めた。

今回は、嚥下を感覚と運動の統合機能とみなして、嚥下誘発領域への化学刺激の変調効果についてこれまでの知見を紹介するとともに、その臨床的意義についても考察する。

SS3-3

歯牙交換の分子生理学的メカニズムと  
歯牙交換異常の病態生理学

福島 秀文

福歯大 細胞分子生物 細胞生理

Notch2 シグナル系が重要な役割をもち、その破綻が破歯細胞の誘導異常や歯牙交換異常をきたすことが明らかとなってきた。

乳歯の生理的歯根吸収は、成長に伴う乳歯列から永久歯列への交換過程において重要な役割を果たしており、その異常は永久歯列の異常につながる。乳歯の歯根吸収は破歯細胞によって引き起こされるが、その誘導制御機構の多くは未だ不明である。

これまで我々は、破歯細胞が破骨細胞とその特徴を多くの点で共有する細胞であることや、その分化誘導には破骨細胞の必須分化因子である RANKL (Receptor Activator NF- $\kappa$ B Ligand) が破歯細胞に発現する RANK (RANKL 受容体) に作用することが重要であることを明らかにしてきた。一方で、この破歯細胞の誘導は乳歯の生理的歯根吸収期や乳歯歯根部に限局して起こることより、破骨細胞とは異なる特異的な制御メカニズムの存在が考えられる。そこで、乳歯の生理的歯根吸収が後続永久歯の萌出に伴い引き起こされることから、萌出中の永久歯胚から分泌され、歯胚萌出に必須の役割を果たす PTHrP (Parathyroid Hormone related protein) に着目し、乳歯根周囲の歯根膜に対する作用を検討した。その結果、PTHrP は歯根膜における RANKL 発現を上昇させ破歯細胞の誘導を促進した。さらに、乳歯の歯根膜細胞に PTHrP が作用する際に発現する遺伝子のプロファイルを検討した結果、Jagged1 の発現上昇が認められた。一方で、我々は破骨細胞の分化誘導において、この Jagged1 が Notch2 シグナルを活性化すると共に、RANKL シグナルと協調して破骨細胞分化を正に制御することを明らかにした。これらのことから、永久歯胚から分泌される PTHrP が、乳歯根膜細胞の Jagged1-Notch2 シグナル系を介して乳歯の生理的歯根吸収を制御する可能性が示唆される。

近年、この Notch2 の変異が Hajdu-Cheney 症候群 (HCS) の原因遺伝子であることが明らかとなり、HCS 患者では重度の骨粗鬆症と乳歯の早期脱落が報告されている。この病態には破歯細胞および破骨細胞の分化亢進が予想されることから、Notch2 の HCS 変異と破骨細胞分化との関係を検討した。その結果、Notch2 の HCS 変異は、ユビキチンライゲース複合体である SCF<sup>F<sup>bw7</sup></sup> による Notch2 タンパクの量的制御機構から免れることにより Notch2 タンパクの量的異常が生じ、破歯細胞および破骨細胞分化が亢進することが分かった。以上のように、乳歯の生理的歯根吸収には、歯根膜細胞における Jagged1-



SS3-4

顎顔面口腔領域における異所性痛覚過敏の末梢神経機構

篠田 雅路

日大 歯 生理

SS4-1

圧縮力による骨細胞のアポトーシスに対する CTGF/CCN2 の役割

山本 照子

東北大 院歯 顎口腔矯正

下顎歯の歯髄炎や歯周炎が原因で、健全な上顎歯の歯痛、頭痛あるいは舌痛を訴える症例に時折遭遇するが、このような疾患の原因部位から離れた部位に疼痛が発症する機構は不明な点が多い。一般に、このような顎顔面口腔領域における異所性疼痛は、各領域からの一次侵害受容ニューロンの延髄への投射部位における収束に起因する（収束説）と考えられている。しかし、三叉神経脊髄路核尾側亜核における三叉神経各枝からの投射は、収束が少なく顎顔面口腔領域における異所性疼痛の発症機構の説明にはならない。最近、顎顔面口腔領域の感覚神経の細胞体およびグリア細胞が存在する三叉神経節内で、さまざまな情報伝達が行われ、一次侵害受容ニューロンの興奮性調節に関与していることがわかってきた。我々は、三叉神経第Ⅲ枝領域の局所炎症により放出された Nerve growth factor (NGF) が三叉神経節へ軸索輸送され、パラクライン機構により三叉神経節内に分泌されること、分泌された NGF シグナルにより Transient receptor potential vanilloid 1 (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熱痛覚過敏が発症することを明らかにした。また、歯髄炎が発症すると三叉神経節においてグリア細胞である Satellite cell が強く活性化し、その活性化が隣接する健全歯の歯髄に投射している一次侵害受容ニューロンにおける TRPV1 の発現を増加させることにより、健全歯に痛覚過敏が発症することを突き止めた。さらに、炎症を起こした歯髄において誘導された Heat shock protein 70 が三叉神経節へ軸索輸送され三叉神経節内に分泌され、近傍の一次侵害受容ニューロンの興奮性を調節していることもわかった。

本シンポジウムでは、三叉神経節内の情報伝達機構についてわれわれの研究結果を中心に最新の報告も交え、顎顔面口腔領域における異所性痛覚過敏の発症機構について考察したい。

機械的刺激は生体の生理的反応や恒常性の維持に必須な因子であり、生体内の様々な細胞が機械的刺激に応答してシグナル伝達が行われている。骨リモデリングは骨芽細胞と、破骨細胞により調節されているが、近年、骨細胞の働きが注目されてきた。骨細胞は細い突起を多数持ち、硬い骨組織のなかで細胞性ネットワークを形成しており、機械的刺激を感じし伝達するメカノセンサーとしての役割を果たすと考えられている。しかし、圧縮力に対する応答性については検討されて来なかった。

結合組織成長因子 (CTGF) とも称される CCN2 は、マトリセルラータンパク質の一つであり CCN ファミリーに属する。CCN2 は細胞増殖、走化性、接着、細胞外基質形成、分化、生存など細胞の種類により様々な機能が報告されている。

我々は、マウスの歯の移動時に、歯槽骨圧迫側の骨細胞で CCN2 遺伝子の発現が上昇し、その後、骨細胞のアポトーシスが増加することを見だし、骨細胞のアポトーシスには CTGF が関与することを示唆した。骨細胞のアポトーシスは骨リモデリングにおいて重要な働きをすることを考えられているが、そのメカニズムは不明な点が多い。そこで、ニワトリ胚頭蓋骨由来の培養骨細胞に対し圧縮力負荷を行い、骨細胞のアポトーシスのメカニズムについて CTGF の関与に着目し *in vitro* で検討した。その結果、圧縮力を負荷すると、骨細胞における CTGF の産生が亢進され、いくつかのアポトーシス経路が活性化された。さらに、圧縮力による骨細胞のアポトーシスには CTGF のシグナル経路である ERK のリン酸化を介することが明らかとなった。

骨吸収には種々のメカニズムが複合して関与しているが、骨への圧縮力によって骨吸収が生じる場合、骨細胞が速やかに応答して CTGF の産生を亢進することで、ERK のリン酸化を来し、骨細胞のアポトーシスが誘導され、それが破骨細胞による骨吸収を促進させると考えられる。

SS4-2

ヒト象牙質・歯髄複合体におけるメタロプロテアーゼと CTGF/CCN2 発現  
室町 幸一郎<sup>1)</sup>、神尾 直人<sup>1)</sup>、松島 潔<sup>1,2)</sup>  
日大 松戸歯 歯内<sup>1)</sup>、日大 口科研<sup>2)</sup>

象牙質と歯髄はともに歯乳頭に由来する細胞によって形作られるだけでなく、機能的な複合体を構築しており、う蝕などの外的刺激が象牙質に加わると歯髄にも病理的反応が伝播し、その応答として第三象牙質（反応性象牙質および修復象牙質）が既存の象牙質に添加されるように、両組織は一単位の組織として捉えることができ象牙質・歯髄複合体と呼ばれている。

私たちの研究グループは、ヒト象牙質・歯髄複合体の治癒過程におけるプロテアーゼの役割を研究する中で、dentin sialophosphoprotein (DSPP) を dentin phosphoprotein (DPP) と dentin sialoprotein (DSP)/dentin glycoprotein (DGP) 複合体に分解するプロテアーゼである bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) がヒトう蝕歯の修復象牙質に発現することを明らかにした。BMP-1 は他の BMP ファミリーとは異なりプロテアーゼ活性を有し、astacin ファミリーに分類されるメタロプロテアーゼである。さらに検討を加えた結果、ヒト歯髄培養細胞において BMP-1 はプロテアーゼ活性に非依存的に connective tissue growth factor / CCN family 2 (CTGF/CCN2) の発現を促進することを見出した。

また、同じくメタロプロテアーゼであり、窩洞形成や断髄後の歯髄において発現が亢進する matrix metalloproteinases-3 (MMP-3) が、ヒト歯髄培養細胞において CTGF/CCN2 の発現および分泌を促進し、その際に MMP-3 のプロテアーゼ活性は必要なく、dynamamin 依存性のエンドサイトーシス経路を介する可能性があること、MMP-3 によるヒト歯髄培養細胞の遊走促進作用が CTGF/CCN2 を介することを過去に報告している。

以上の結果は、ヒト象牙質・歯髄複合体において BMP-1 および MMP-3 が基質となるタンパク質の分解だけでなく、プロテアーゼ活性非依存的にリガンドとして細胞に作用を及ぼす可能性があるものと示唆される。

SS4-3

歯肉上皮細胞に対する低出力超音波パルス照射の影響について  
正木 千尋、向坊 太郎、近藤 祐介、  
中本 哲自、細川 隆司  
九歯大 口腔再建リハ

低出力超音波パルス (Low-intensity pulsed ultrasound stimulation: LIPUS) 照射は、*in vivo* においてインプラント体と周囲骨の早期のオッセオインテグレーションを可能とし、臨床においても治療の短縮や、骨欠損部への新生骨の獲得のために応用されているものの、周囲軟組織に及ぼす影響については明らかにされていない。そこで本研究では軟組織の治癒促進に対し、LIPUS の影響を明らかにするため、マウス由来株化正常歯肉細胞 (GE1 cell) を用いて組織修復や細胞増殖、血管新生に関わる重要なサイトカインである CCN2/CTGF の遺伝子発現およびタンパクレベルでの検討を行った。GE1 cell を 6 穴のプラスチックディッシュ上に SFM-101 培地中で培養した。培養開始後 1 日目から周波数 3 MHz、出力 240 mW の LIPUS を 15 分間照射した。照射直後、15 分後、30 分後、1 時間後、2 時間後 RNA を回収し、リアルタイム PCR 法を用いて CCN2/CTGF の mRNA 発現量の検討を行った。また、Western blotting 法を用いてタンパク量の検討を行った。さらに、LIPUS 照射直後、15 分、30 分、45 分、60 分後に細胞を回収し、MAPK (ERK, p38) の活性化の検討を行った。その結果、照射直後、15 分後に CCN2/CTGF の mRNA 量の増加が認められ、LIPUS 照射 60 分後にタンパク量の増加が認められた。一方、LIPUS 照射 30 分後に ERK および p38 のリン酸化の亢進がみられた。以上の結果から、LIPUS 照射により、CCN2/CTGF の mRNA 量およびタンパク量の増加が認められ、臨床における軟組織治癒促進効果との関連が示唆された。

SS4-4

軟骨細胞における CCN2 発現及び産生量に与える低出力性超音波 (LIPUS) の効果

西田 崇<sup>1)</sup>、久保田 聡<sup>1)</sup>、青山絵理子<sup>2)</sup>、山中 信康<sup>3)</sup>、滝川 正春<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>岡大 院医歯薬 口腔生化、<sup>2)</sup>岡大 歯 機能系共同利用、<sup>3)</sup>伊藤超短波 (株)

**【目的】**我々は CCN family member 2/結合組織成長因子 (CCN2/CTGF) が軟骨細胞の増殖・分化を促進すること、実験的変形性関節症 (OA) モデルにおいて軟骨修復作用を示すことを報告した。それ故、我々は CCN2 が OA 治療に有効な分子になると考えているが、その投与方法を模索していた。ところで、低出力性超音波療法 (Low-intensity pulsed ultrasound: LIPUS) は簡便に低侵襲性に細胞に刺激を与え得る方法であるため、今回、LIPUS 刺激した軟骨細胞で CCN2 の発現・産生が亢進するかを解析し、LIPUS による CCN2 の新しい投与方法の可能性について検討した。

**【方法】**ヒト軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8、ラット軟骨細胞様細胞株 RCS、ラット初代関節軟骨細胞 RAC を超音波治療器 (ST-SONIC: 伊藤超短波社製 3.0 MHz, 30-60 mW/cm<sup>2</sup>) で 20 分間刺激した。刺激終了後 30 分で total RNA を、5 時間でタンパク質を採取し、定量 RT-PCR 及び Western blot 法で CCN2 の発現及び産生量を解析した。また、F-actin は Phalloidin を用いた蛍光染色で検出した。

**【結果】**HCS-2/8、RCS、RAC 細胞共に LIPUS 刺激 (3.0 MHz, 60 mW/cm<sup>2</sup>, 20 分) によって CCN2 の遺伝子発現量及びタンパク質産生量は増加した。また、LIPUS 刺激後時間経過と共に HCS-2/8 細胞周囲に F-actin の集積がみられた。さらに、actin 重合に関わる Rho A 経路の阻害剤処理によって LIPUS で誘導された CCN2 の遺伝子発現レベルは減少した。

**【考察】**これらの結果は LIPUS 刺激による Rho A 経路の活性化を介して、軟骨細胞に F-actin の重合促進と CCN2 の産生亢進が引き起こされたことを示唆している。今回の結果から LIPUS は軟骨細胞に低侵襲性に CCN2 を投与できる新しい方法であると考えられた。

SS4-5

CCN4/WISP-1 の骨形成における役割  
 大野 充昭<sup>1)</sup>、前田あずさ<sup>1,2)</sup>、正木明日香<sup>1)</sup>、吉岡 裕也<sup>1)</sup>、園山 亘<sup>1)</sup>、窪木 拓男<sup>1)</sup>、Marian F. Young

<sup>1)</sup>岡大 院医歯薬 インプラント再生補綴、<sup>2)</sup>NIDCR/NIH

CCN4/Wnt-Induced Secreted Protein-1 (WISP-1) は、骨折の治療過程や骨分化過程において高発現することが報告されているが、CCN4 が骨形成に与える影響は未だ明らかでない。本研究では *in vivo* での CCN4 の機能、および骨の形成や再生、組織の形態維持に重要な役割を担っている BMP-2 との関係性を明らかにしたので報告する。Col 1a1 プロモーターを用いた CCN4 過剰発現 (Tg) マウス、ならびに CCN4 欠損 (KO) マウスを作製し、CCN4 の骨形成に与える影響を micro-CT を用いて検討した。その結果、Tg マウスでは大腿骨の骨密度 (BMD) ・海綿骨骨量 (BV/TV) の増加、KO マウスでは大腿骨の BMD ・BV/TV の減少を認めた。さらにこれら Tg マウス、および KO マウスから骨髄由来間葉系間質細胞 (mBMSCs) を単離し、それぞれの BMSCs の骨芽細胞分化能を検討した。その結果、野生型マウス由来 BMSCs と比べ、Tg マウス由来 BMSCs は骨芽細胞分化能が高く、KO マウス由来 BMSCs は低かった。

次に、CCN4 と BMP-2 の関係を明らかにするため、固相化結合実験および免疫沈降実験を行い、CCN4 と BMP-2 が直接結合することを確認した。また、ヒト骨髄由来間葉系間質細胞 (hBMSCs) に CCN4 および BMP-2 を強制発現させ、hBMSCs の骨芽細胞分化能を検討した。その結果、CCN4 は BMP-2 によって誘導される Smad シグナルのリン酸化および骨芽細胞分化を増強させた。さらに、shRNA にて CCN4 の発現を抑制することで、BMP-2 によって誘導される Smad シグナルのリン酸化および骨芽細胞分化は抑制された。また、これら CCN4 の BMP-2 に対する機能は integrin $\alpha$ 5 $\beta$ 1 によって制御されていることが、抗体を用いた阻害実験により示された。

以上の結果から、CCN4 は BMP-2 による BMSCs の骨芽細胞分化を正に制御することで骨形成を促進することが明らかとなった。



SS5-1

歯髄幹細胞を用いた歯髄・象牙質再生治療の実用化に向けて  
中島美砂子  
国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター

超高齢社会を迎え、歯髄を保存することは、歯の延命化による全身の健康維持、医療・福祉経済の安定化につながる重要なことである。私どもは、抜髄・感染根管治療に対して、「歯髄幹細胞および遊走因子 G-CSF を用いた新規の歯髄・象牙質再生治療法」の開発を行ってきた。まず、歯髄幹細胞を臨床応用するために、従来のフローサイトメトリーや磁気ビーズ法にかわる安全で安価、高効率の幹細胞膜分取法を新規に開発した。ついで、GMP 準拠細胞加工施設内で標準作業手順書 (SOP) に基づきヒト歯髄幹細胞を分取・培養、凍結保存し、安全性と品質を確認した。また、イヌ非臨床研究での抜髄後自家歯髄幹細胞移植による歯髄・象牙質再生の安全性および有効性を確認し、その再生メカニズムも明らかにした。これらの結果により厚生労働省から臨床研究実施を認可され、現在、臨床研究を行っている。さらに、同一個体由来のブタあるいはイヌ歯髄幹細胞を骨髄・脂肪と比較したところ、歯髄幹細胞は増殖、遊走能が高く、血管新生・神経栄養因子を高発現していた。また、血管新生・神経再生能および歯髄再生能に優れていた。ただし、脂肪・骨髄幹細胞を用いても歯髄・象牙質再生は可能であり、歯髄を供給する歯がない場合は脂肪・骨髄幹細胞が歯髄再生のための細胞源となりうる。さらに、高齢においても若齢と同様の形質と再生能を有する歯髄幹細胞を分取できたが、イヌ抜髄モデルに自家移植した場合の歯髄再生量はやや劣っていた。またイヌ感染根管モデルにおいても、抜髄モデルと同様に歯髄は再生された。以上のことから、幹細胞形質および再生能に優れた歯髄幹細胞を抜髄・感染根管治療後の歯髄・象牙質再生治療に臨床応用する可能性が示唆された。

SS5-2

再生医療資源としての歯髄細胞利用  
手塚 建一  
岐阜大学 院医 組織形成

Human dental pulp cells (DPCs) are present in the cell population isolated from dental pulp tissues (Gronthos *et al.*, PNAS 2000, JDR 2002; Takeda *et al.*, JDR 2008; Iida *et al.* Arch. Oral Biol. 2010). We reported that viral introduction of four transcription factors (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, and *c-MYC*) can reprogram DPCs into induced pluripotent stem (iPS) cells, which closely resemble embryonic stem cells (Tamaoki *et al.*, JDR 2010, Okita *et al.* Nature Methods 2011). However, establishing quality-controlled iPS cell lines from a large number of individual patients is not easy and validation of them requires considerable time and cost.

Human leukocyte antigen (HLA) plays an important role in immune rejection of tissues and cells transplanted from allogenic donors. In recent days, tissue transplantation is conducted without complete matching of HLA because of shortage of the donors. Instead of matching HLA types, immunosuppressants are frequently used to prevent immune reaction both host to graft and graft to host directions; however, when the immune system function is suppressed, there is an increased susceptibility to infectious diseases and cancers.

To solve this problem, usage of HLA haplotype-homo donors has been considered in tissue regenerative treatment. HLA haplotype-homo donors have a couple of identical HLA gene sets, resulting in presentation of HLA molecules half in the variation. Therefore, iPS cells derived from HLA haplotype-homo donors are expected to be successfully transplanted to many patients with less possibility of rejection. Potential risk of GVHD will be omitted by strictly avoiding the contamination of hematopoietic cells. We screened approximately 180 DPC lines to find three patients having only one genotype in each of three HLA loci, A, B, DRB1. If iPS cells will be established from these three patients, they are expected to show complete match with more than 20% of the Japanese population.

We believe that DPCs are one of the somatic cell sources for future iPS cell banking and regenerative medicine.



SS5-3

ヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清を用いた難治性全身疾患に対する新しい再生療法の開発

山本 朗仁

名大 院医 頭頸部・感覚器外科・歯科口腔外科

幹細胞移植による再生医療は、様々な難治性疾患に高い治療効果を発揮することが期待されている。しかしながら、移植細胞の生着率は低く、治療効果の多くは幹細胞が分泌する様々な組織再生因子によるものであることが明らかになってきた。本研究では、ヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清 (CM) の組織再生能力を、ラット脊髄損傷および劇症性肝炎モデルを用いて検証した。ヒト歯髄幹細胞 CM を損傷したラット脊髄にも膜下腔に持続投与すると下肢運動機能が劇的に改善することを見出した。一方、ラット劇症肝炎発症後に歯髄幹細胞 CM を 1 回静脈内投与し、著しい生存率の向上と病態改善を確認した。両モデルシステムにおいて、骨髄間葉系幹細胞 CM、脂肪幹細胞 CM、線維芽細胞 CM の投与では十分な治療効果が得られなかった。詳細な解析によって、歯髄幹細胞 CM はミクログリア、マクロファージ、クッパー細胞などの自然免疫担当細胞を抗炎症・組織修復タイプへと形質転換し、損傷後の組織破壊的な炎症環境を修復・再生環境へと導き治癒を促進することが明らかとなった。これらの研究成果は、歯髄幹細胞が他の幹細胞に無い特異な組織再生効果を発揮する成体幹細胞であることを示している。本シンポジウムではこれらの研究成果を踏まえた臨床応用への道筋について議論する。

SS5-4

凍結ヒト歯髄組織の臨床応用の可能性

山座 孝義

九大 院歯 分子口腔解剖

現在、疾患の再生医療に対する幹細胞の応用が非常に期待されている。造血幹細胞は半世紀以上に渡り様々な疾患治療 (白血病や再生不良性貧血、自己免疫疾患など) に用いられ、優れた治療成果を上げており、唯一広く臨床応用されている組織幹細胞 (成体幹細胞) である。組織幹細胞の一種である間葉系幹細胞は様々な成体組織 (骨髄、脂肪組織、歯など) から単離・同定される一方、間葉系幹細胞を用いた疾患治療も精力的に報告されている。しかし、間葉系幹細胞を用いた臨床応用を考える場合、細胞の品質や安全性の担保、保存法など様々な問題点を克服する必要が残されている。

歯髄幹細胞は永久歯や乳歯の歯髄より単離される間葉系幹細胞である。現在までに歯髄幹細胞は象牙質/歯髄複合体の再生のみならず、骨欠損や自己免疫疾患、脊髄損傷などへの疾患治療効果が報告されており、将来歯髄幹細胞を用いた再生治療への応用が大いに期待されている。一方で、歯髄からの幹細胞単離は複雑で時間を有する作業である。従って歯髄組織そのものを凍結保存することが可能となれば歯髄幹細胞の供給源として非常に有用である。

本シンポジウムでは、我々が2年以上に渡り凍結保存していたヒト歯髄組織を用いて、長期凍結歯髄組織より単離した幹細胞の幹細胞学的機能解析ならびにその幹細胞を用いた疾患治療効果について議論を進める予定である。

SS6-1

胎仔マウス顎下腺の組織間における  
microRNA 輸送

林 徹

朝日大 歯科薬理

近年、生体内で多彩な non-coding RNA が発現していることが分かり、これまで知られていなかった RNA の振る舞いが明らかになってきた。とりわけ小分子 RNA の一種、microRNA (miRNA) については比較的解明が進んでいる。miRNA は 20 塩基前後の RNA で、タンパク質と複合体を形成し標的とする遺伝子の発現および翻訳を調節することで、様々な高次生命現象に関与している。興味深いことに、様々な細胞が miRNA を分泌し別の細胞によって取り込まれていることが明らかになった。取り込まれた miRNA は「受け手」の細胞の遺伝子発現を調節していたため、miRNA はホルモンなどと同じく mobile signal として細胞と細胞間のコミュニケーションを仲介していることが示唆されている。しかしながら細胞間だけでなく組織間や器官間など、より高次の生体構造における miRNA コミュニケーションの報告例はなく、今後の進展が期待される分野である。

胎生期のマウス顎下腺は主に上皮と間葉から構成される器官であり、それら組織間の相互作用を研究するうえで良いモデル器官として知られてきた。これまでに様々な成長因子やその受容体、細胞外マトリックスなどが相互作用に関与することがわかっているが、miRNA については明らかになっていない。そこで演者は miRNA が mobile signal として上皮間葉相互作用に関与しているのではないかと仮説を立てた。いくつかの実験の結果、胎仔マウス顎下腺の上皮間葉間で miRNA が移動していることが示唆された。本発表では得られた知見を紹介し御批判を頂戴しながら、組織間 miRNA 輸送という仮説、その生物学的意義や今後の展望について議論出来たらと考えている。

SS6-2

プロトンポンプ (V-ATPase) は唾液  
分泌にどのように関わるのか佐原 資謹<sup>1)</sup>、堀江 沙和<sup>1,2)</sup>、大宮  
麻美<sup>1,3)</sup>、梅木 悠人<sup>1,3)</sup>、後藤 (松元)  
奈緒美<sup>3)</sup>、中西 (松井) 真弓<sup>3)</sup><sup>1)</sup>岩医大 病態生理、<sup>2)</sup>岩医大 医歯薬  
総研 腫瘍生物、<sup>3)</sup>岩医大 薬 機能  
生化

V 型プロトンポンプ (V-ATPase) には、リソソーム、エンドソーム、シナプス小胞などの細胞内膜に存在してオルガネラの酸性化に関与するタイプと、腎臓や精巣、膵臓の  $\beta$  細胞などの内分泌腺、破骨細胞などの細胞膜に存在し細胞外環境の酸性化に関与する 2 つのタイプがある。細胞質側にあり ATP 結合部位をもつ  $V_1$  ドメイン (A~H サブユニット) と、膜内にあり  $H^+$  輸送路をつくる  $V_0$  ドメイン (a, c, c', c'', d サブユニット) とが合体して、V-ATPase 機能を発揮することが知られている。各々サブユニットにはアイソフォームが存在し、組織・細胞により発現が異なる。唾液腺では、V-ATPase の局在、機能ともに未だ明らかでない点が多い。そこで、大唾液腺における V-ATPase の存在を RT-PCR 法で検索したところ、a3, d1, B2, C1, E2 サブユニット・アイソフォームの発現が認められた。B2 サブユニット・アイソフォームの局在を免疫組織化学法で検索した結果、大唾液腺導管部に局在して強い免疫蛍光が見られた。耳下腺では、導管上皮細胞の頂部および細胞質に、舌下腺では導管上皮細胞の細胞質に、顎下腺では導管上皮細胞の細胞質に加えて顆粒性導管上皮の基底部に免疫蛍光が見られた。さらに、a3 サブユニット・アイソフォームのノックアウトマウス (a3-KO マウス) を解析したところ、唾液の分泌量が a3-KO マウスでは明らかに減少し、唾液の pH はコントロールマウスに比べて酸性化した。大唾液腺重量の減少はみられるものの、組織構造に大きな変化はみられなかった。唾液腺導管部上皮では、腺房から分泌された原唾液の  $NaCl$  吸収と、 $K^+$  と  $HCO_3^-$  の分泌が起こることを考え合わせると、唾液腺導管部の V-ATPase は唾液の pH 調整に関与する可能性が示唆される。

SS6-3

耳下腺における唾液タンパク質の分泌  
顆粒への輸送機構

吉垣 純子、福島美和子、横山 愛、  
加藤 治  
日大 松戸歯 生理

SS6-4

唾液中のエキソソームと病気診断—水  
チャンネル・アクアポリン-5 を中心にし  
て—

石川 康子、Pieczonka Tomasz、  
Bragiel Aneta  
徳大 院 HBS 分子薬理

唾液分泌能が低下すると、唾液中の抗菌・保護物質が失われ、口腔内疾患のリスクが高まる。唾液腺は口腔内から導管を通して逆行的に遺伝子導入を行うことができるため、唾液腺に有用物質を強制発現・分泌させる治療法が提案されている。一方、口腔内や消化管に必要な抗菌・保護タンパク質だけでなく、血液を介して全身へ供給されるタンパク質を唾液腺に発現させることも可能であると考えられており、全身疾患の治療への応用が期待されている。

しかし、有用タンパク質を発現させても、必要な場所へ供給できなければ効果は期待できない。唾液腺には外分泌的に口腔内・消化管内へ供給される経路と、内分泌的に血液に供給される経路が存在する。唾液タンパク質は分泌顆粒に貯留され、刺激依存的に管腔に分泌される（調節性分泌）。一方、合成された後、細胞内に貯留することなく直ちに分泌されるタンパク質も存在し、構成性分泌と呼ばれている。構成性に分泌されるタンパク質は、多くが基底膜側、つまり血中に放出されると考えられている。そこで、唾液腺内で合成されたタンパク質が調節性分泌と構成性分泌へ振り分けられるメカニズムを知ることが重要になる。

我々は、分泌タンパク質の細胞内輸送を解析するために、耳下腺腺房細胞の初代培養細胞にリポータータンパク質である HaloTag を発現する系を開発した。分泌タンパク質と HaloTag の融合遺伝子を導入し、2つの経路への選別機構について検討を行った。その結果、唾液アミラーゼのシグナルペプチド配列のみを付加した HaloTag (ssHalo) が分泌顆粒へ輸送され、刺激依存的に分泌されることを見いだした。シグナルペプチド配列はタンパク質合成後、小胞体で切断されるため、ゴルジ装置で選別を受ける際には、ssHalo は単なる HaloTag になっている。したがって、調節性分泌への輸送には、特別なシグナルが必要ないことが示唆された。

エキソソーム(exosome)はエンドソームから形成された脂質二重膜小胞であり、多胞体エンドソーム(multivesicular body)内に含まれており、多胞体が細胞膜と融合するとエキソソームが細胞外に放出されることが知られている。血清、母乳、尿、唾液等にエキソソームの存在が認められている。そして、これらのエキソソーム中の蛋白質がプロテオーム解析され、病気診断に使われている。

Gonzalez-Begne らはヒト耳下腺唾液よりエキソソームを得、ショットガン法により解析して、ヒト耳下腺唾液エキソソームには 491 種の蛋白質が含まれており、そのうち 26% が膜蛋白質、43% が細胞質蛋白質である。Ogawa らはヒト全唾液を二次元電気泳動やショットガン法により直径の違いから二種類のエキソソームを得、どちらのエキソソームにも I 型、II 型、4~7 回膜貫通型膜蛋白質は含まれているが、アミラーゼやプロリン・リッチ蛋白質は含まれていないこと等を報告した。

両研究において唾液中エキソソームに存在が認められているアクアポリン-5(AQP5)は、昼間に濃度が高く、夜間に低い日内リズムを示しながら唾液へと放出されていた。この唾液中 AQP5 濃度は、ある一定時間(9AM~9PM)に測定すれば、成熟後は加齢とともに低下した。糖尿病やシェーグレン症候群の患者唾液中においても低下した。また、唾液中 AQP5 濃度は、唾液量とよい相関を示していることから、口腔乾燥症のバイオマーカーとして使い得る。さらに、唾液中の AQP5 量は塩酸ドネベジルを服用したアルツハイマー型痴呆患者の唾液で増加することから、ドネベジルの飲み忘れをチェックするマーカーに利用できる。

次に、唾液中エキソソームに存在が認められた Na チャネル(ENaC)と Cl チャネル(CLC-Ca)は高食塩水飲用 SHR ラットの唾液エキソソームで濃度低下が認められなかったことから、食塩感受性と非感受性高血圧を分けるマーカーとして使える可能性がある。

唾液のプロテオーム解析による病気診断法は、まだ知見が少なく、今後の開発が待たれる。(会員外共同研究者 大塚製薬株・岩田房子、大本安一、森豊樹)

SS6-5

ウイルスベクターを使った唾液腺へ遺伝子導入とイメージング解析への応用  
谷村 明彦、根津 顕弘、森田 貴雄  
北医大 歯 薬理

唾液腺の水・電解質分泌は、主にムスカリン受容体を介する  $\text{Ca}^{2+}$  応答によって調節されている。ライブイメージング技術を使ったこれまでの研究で、唾液腺腺房細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  ウェーブや  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーション、唾液腺導管における自発的  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションなどの知見が得られてきた。我々はアデノウイルスベクターをラット顎下腺開口部から逆行性に注入し、蛍光タンパクを腺房細胞に発現させる技術を確認した。この技術によって、蛍光分子センサーや機能調節に関与する分子を唾液腺細胞に発現させることが可能になった。これによって生きた動物を使った intravital イメージング解析が可能になった。さらに遺伝子導入による唾液腺腺房細胞の機能制御の可能性が期待される。

本サテライトシンポジウムでは、顎下腺細胞に発現させた G-GECO や YC-nano50 等の Genetically Encoded Calcium Indicators (GECI) の蛍光変化を、様々なイメージングシステムを使った intravital イメージング解析で調べた結果を紹介する。特にマクロズーム蛍光顕微鏡を使った実験では、顎下腺全体の  $\text{Ca}^{2+}$  応答と同時に、レーザーベックル血流計を使った血流のイメージング解析が可能である。この実験系を使った解析結果から、アセチルコリンやピロカルピンの腹腔内投与や静脈内投与に加えて、舌神経を介する反射的副交感神経刺激による顎下腺の  $\text{Ca}^{2+}$  応答や血流反応を比較する。これらに加えて、共焦点レーザー顕微鏡を使った高解像度イメージングやタッチスコープを使った低侵襲的 intravital イメージングの実例を示す。また分子センサーと遺伝子導入系の新しい試みとして、アデノ随伴ウイルスを使って蛍光センサーを安定発現させた実験系や、高輝度発光センサーを使った発光イメージング解析の結果を紹介する。さらに、これらの技術を応用した唾液腺の病態解析や、遺伝子を使った唾液腺の機能制御の可能性について考察する。

SS6-6

唾液腺における GABA 受容体機能の新しい展開  
川口 充  
東歯大 薬理

The past decade has significant advances in understanding xerostomia via GABA (A)-like receptors and central or peripheral type benzodiazepine receptors (CBR or PBR) existing in the salivary glands. The stress-induced xerostomia seems to be associated with an elevation of the plasma steroid hormone levels, which exert potent physiological effects by allosterically modulating not only synaptic but also extrasynaptic GABA (A) receptors. Recent our studies, however, have demonstrated that both the methamphetamine withdrawal stress and the benzodiazepine stimulation upregulate steroidogenesis in salivary glands through PBR which mediate to produce CYP11A1, an enzyme synthesizing pregnenolone from cholesterol. Interestingly, they simultaneously increased in mRNA expressions and peptide signals of a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), PACAP type 1 (PAC1) receptor, diazepam binding inhibitor (DBI), and PBR as sequential transduction factors for producing pregnenolone. Our results suggest that withdrawal stress and benzodiazepines locally produce pregnenolone to modulate the GABA (A)-like receptor functions for enhancing suppressive effect of saliva secretion.



SS7-1

2型糖尿病における口腔粘膜の微細血管構築

上村 守、諏訪 文彦  
大歯大 解剖

SS7-2

筋発育過程における微小血管形成因子発現状況の検討

春原 正隆、佐藤 巖  
日歯大 生命歯 解剖一

自然発症2型糖尿病モデルラット（GKラット）における口腔粘膜（舌背；糸状乳頭、上顎第一臼歯口蓋側歯肉、口蓋粘膜）の微細血管構築を正常ラットと比較し、考察を試みた。

実験動物は、生後8週齢Wistar系雄性ラット9匹（空腹時血糖値：135.3±14.8 mg/dL）を正常群とし、同週齢GK雄性ラット9匹（空腹時血糖値：213.4±22.6 mg/dL）を糖尿病群として、合計18匹を用いた。上行大動脈にカニューレを挿入し、生理食塩水にて脱血後、アクリル樹脂を注入し、微細血管鋳型標本を作製した。走査型電子顕微鏡で観察した後、画像撮影を行い、糸状乳頭、上顎第一臼歯口蓋側歯肉、口蓋粘膜の毛細血管の画像解析を行った。各画像解析値は両群間で危険率1%で統計処理を行った。

糸状乳頭：両群共に、結合組織乳頭内に存在する毛細血管ループが、咽頭側に傾斜しているのが観察された。細動脈から結合組織乳頭内へ立ち上がった上行脚はヘアピン状のループを作り、下行脚となり結合組織乳頭下の細静脈網に注いでいた。毛細血管ループの直径・高さの値を比較すると、糖尿病群が正常群より有意に小さかった。しかし、毛細血管ループの個数、間隔を比較すると、有意差は認められなかった。口蓋側歯肉：遊離歯肉内の毛細血管網は、正常群では長方形を、糖尿病群では楕円形を呈していた。歯肉頂直下の毛細血管の走行は、正常群では直線状を、糖尿病群では波状を呈していた。この毛細血管の直径の値は、糖尿病群が正常群より有意に小さかった。口蓋粘膜：両群共に、口蓋粘膜の微細血管構築は、亀甲型の網目を呈している毛細血管網であった。糖尿病群の網目よりも正常群の網目のほうが小さかった。毛細血管の直径の値は、糖尿病群が正常群より有意に小さかった。

以上から、上記部位の口腔粘膜の毛細血管は、高血糖によって糖尿病性細小血管症が引き起こされていた。

我々は、咀嚼筋発育過程において、吸啜から咀嚼へと機能が大きく変化する時期において各種筋線維タイプの局在および経時的発現状況の解析を行うとともに、頭頸部領域の脈管系におけるCD31およびLYVE-1のmRNAの発現状況と、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）。

近年、骨格筋のリンパ管は運動レベルに応じて変化すること（Gehlert S, 2010）、さらに外側広筋では血管マーカーとリンパ管マーカーが共に発現していることが報告され（Kivelä R, 2007）、筋内部におけるリンパ管存在の可能性が示唆された。また、筋発育過程および筋損傷後の筋周囲組織には血管マーカーの発現が認められるとの報告、さらには筋の機能に応じて血管網が変化するとの報告もある（Pette and Staron, 2000；Egginton *et al.*, 2001）。

他方、我々はこれまでの研究により、頭頸部領域において血管形成に関与することが予想される遺伝子に関する基本的な情報を得ている（Biochem Biophys Res Commun. Sunohara M *et al.*, 2007; Calcif Tissue Int. Sunohara M *et al.*, 1996）。

本研究においては、咀嚼筋の1つである咬筋に着目し、頭頸部領域の筋発育過程における脈管系マーカーおよび血管新生抑制マーカー（tenomodulin）の経時的発現状況を解析するとともに、機能変化をふまえた筋発育過程における筋微小血管系の動態について検討し報告する。

SS7-3

癌化学療法における Drug Delivery Route としてのリンパ管  
安藤 禎紀、藤村 朗  
岩医大 解剖 機能形態

SS7-4

腫瘍微小循環系の制御による腫瘍増殖抑制の試み  
北原 秀治  
東女医大 医 解剖・発生生物

我々は、抗癌剤を腫瘍周囲に注入することで原発巣およびその周囲のリンパ管経由で所属リンパ節の癌細胞をも叩けること、しかも、全身に対する投与量を減量できる可能性を報告した。この方法での問題は投与薬剤の濃度、投与時の刺入傷治癒遅延、投与のたびの痛み等であるが、薬剤をリポソーム化(徐放化)することで解決の可能がみいだせた。

【材料および方法】抗癌剤は日本化薬株式会社から供与された動物実験用シスプラチン粉剤をリポソーム化して用いた。A 群：直径 100 nm のリポソームと、B 群：直径 100 nm (75%) と 800 nm (25%) の混合リポソームを作製した。これらのリポソームをマウス舌辺縁部に 0.1 mg/ml の濃度で 10  $\mu$ l を注入した。24 時間後、左右顎下リンパ節と舌を摘出し、直ちに乾燥を施し、舌は硝酸灰化法により試料調整を行い、顎下リンパ節については無標準法により PIXE を用いて計測した。さらにリポソーム (150 nm) の表面を改良し、長時間の薬物保持を目的とした wrapped タイプ、より長時間の薬物保持を目的にリポソーム膜を固くした hard タイプを作製し、同様の手順で白金量を計測した。

【結果】舌には A、B 群ともに 20~30  $\mu$ g/g、顎下リンパ節には A 群が 20~30  $\mu$ g/g、B 群では約 200  $\mu$ g/g の白金が到達していた。さらに行ったリポソーム表面改良型のリポソームでもすべてのグループにおいて基準量以上の白金量を検出した。

【考察】ウサギによる静脈内注射による抗癌作用は白金量 2.6  $\mu$ g/g であり、投与局所(腫瘍原発部位を想定)および所属リンパ節においてすべてのリポソーム化シスプラチンは抗癌作用を発揮するに十分な濃度が保てた。今後は、リポソームのサイズによる所属リンパ節への到達率、さらに、注射による痛みを避けるため、粘膜経由可能なリポソームサイズを検索していきたいと考えている。

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。新生した腫瘍血管は、正常組織の血管とは形態や機能が大きく異なっており、そのメカニズムの解明が、頭頸部領域の腫瘍のみならず、臨床医学全体において非常に重要である。近年、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ものの、その治療法も未だ確立されておらず、副作用などの問題も懸念される。そこで、さらなる腫瘍血管の特性の解析と、それに対応した新たな癌治療法の開発が望まれる。われわれは、大腸癌の原因遺伝子の一つである APC 遺伝子を変異させた *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスをモデルとして、局所における微小循環系の変化の過程を、正常から腺腫へ、そして徐々に腺癌へ移行していく自然発症消化管腫瘍の特徴 (多段階発癌) に着目して追跡している。これまでに、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。そこで本研究では、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ことができるのではないか? という仮説を立て、血管新生因子である Vasohibin-2 (VASH2) に注目し、さらに研究を行った。*Apc*<sup>Min/+</sup> マウスと、*VASH2* 遺伝子をノックアウトしたマウス (*Vash2*<sup>-/-</sup>) を用いてダブルミュータントマウスを作製し、腫瘍発育や腫瘍血管の変化を解析したところ、腫瘍血管の減少と共に、腫瘍発症の減少がみられた。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、既存の抗癌療法とも併用する新しい治療法の開発につながることを期待された。

SS8-1

Anaerobic culture to detect periodontal and caries pathogens

Anne C. R. Tanner

Dept. of Microbiol., The Forsyth Inst.

ated in advanced disease were also found in initial lesions suggesting a continuum of infection from early to late stages of these dental diseases.

Many periodontal and dental caries pathogens were detected and described using anaerobic culture studies from The Forsyth Institute. Species recognized from advanced periodontitis included *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* and *Tannerella forsythia*. Additional species detected in initial periodontitis included *E. saphenum*, *Filifactor alocis* and *Selenomonas noxia*. Molecular studies found an association of *P. gingivalis* and *T. forsythia* with initial periodontitis in young adults.

Anaerobic culture technique applied to severe (advanced) early childhood caries revealed new species, *Scardovia wiggisiae*, in addition to *Streptococcus mutans* as disease associated. *S. wiggisiae* is an anaerobic gram positive rod species in the *Bifidobacteriaceae* family of the *Actinobacteria* phylum. *Scardovia wiggisiae* is acidogenic and acid tolerant, cariogenic traits of *S. mutans*. Cultivation of samples at plaque low pH indicated that only a subset of over 200 species detected was acidogenic and acid-tolerant and thus likely involved in caries-progression. Other species including *Bacteroidetes*, *Selenomonas* and *Fusobacterium* species were not acid tolerant, suggesting that while these taxa can be detected in caries samples they are not likely involved in cavity formation. Cluster and discriminant analyses of the microbiota of severe childhood caries indicated that *S. wiggisiae* was important in the bacterial complex associated with childhood caries.

Initial stages of dental caries are recognized as white spot lesions. Some children with fixed orthodontic appliances develop white spot initial carious lesions in addition to gingivitis. Using the HOMIM microarray, a greater proportion of species assayed were associated with gingivitis compared with dental caries. Using quantitative PCR, *S. mutans* and *S. wiggisiae* were associated with white spot lesions, whereas bifidobacteria were associated more with gingivitis.

In both periodontitis and caries, species associ-

SS8-2

The interaction between *Fusobacterium nucleatum* and the erythrocyte: Impacts on the host immune system  
Saori Yoneda, Riyoko Tamai, J. Merritt, Yusuke Kiyoura  
Dept. of Oral Med. Sci., Ohu Univ., Sch. of Dent.

*Fusobacterium nucleatum* is an anaerobic and gram-negative, oral and systemic commensal bacterium. *F. nucleatum* is known for its ability to adhere to many kinds of both prokaryotic and eukaryotic cells. However, little is known on the cellular response of *F. nucleatum* to coaggregation with other cells. In the process of the preliminary examining coaggregation, we found *F. nucleatum* changed their morphology after they coaggregated with the erythrocyte, which is a sign of acute inflammation. Therefore, we hypothesized there are some adherence responses between *F. nucleatum* and the erythrocyte. The objective of this study was to characterize some regulations between *F. nucleatum* and the erythrocyte.

*F. nucleatum* ATCC strain 25586 was grown under anaerobic conditions in Artificial Saliva Solution (ASS) supplemented with hemin and menadione. The *F. nucleatum* cultures with or without the sheep erythrocyte were lysed and RNA was extracted to use for a microarray analysis and real-time qRT-PCR. To analyze the cell-surface alteration of *F. nucleatum*, we used the approaches to introducing aldehydes onto cell-surface for subsequent ligation with aminoxy-biotin. And, *F. nucleatum* cultures with or without the erythrocyte were injected to each three of *Galleria mellonell* for the killing assay.

We found 10 genes of *F. nucleatum* that were affected after about 5 h of aggregation with erythrocyte using the microarray analysis and only Sialic Acid binding protein (FN1472) gene of *F. nucleatum* culture with erythrocyte was expressed upper via real-time PCR to confirm the microarray results. Moreover, we found this FN1472 gene exhibited the increase in expression due to addition of Sialic Acid using real-time PCR. After the biotin labeling of the cell-surface, all *F. nucleatum* strains with erythrocyte in ASS were shown to sialylate on their surface. On the killing assay, there were no

killed *G. mellonella* among both control and the erythrocyte groups. All *G. mellonella* in the erythrocyte group, which were injected *F. nucleatum* with erythrocyte, had severe inflammation whereas no *G. mellonella* in the control group had even mild inflammation.

Our data suggests the interaction between *F. nucleatum* and the erythrocyte induced FN1472 gene regulation and cell-surface modulation of *F. nucleatum*. Further, it is possible this cell-surface regulation and decoration also impacted on host immune mechanism. Based on the role of FN1472 gene in some previous reports, we speculate that *F. nucleatum* may elude host immune system to modify their cell-surface and masquerade as 'self' for this sialylation.



SS8-3

Cell surface coaggregation receptor polysaccharide in *Streptococcus sanguinis*

Yasuo Yoshida<sup>1)</sup>, Jinhua Yang<sup>2)</sup>, Keiji Nagano<sup>1)</sup>, Yuki Abiko<sup>1)</sup>, Fuminobu Yoshimura<sup>1)</sup>, John O. Cisar<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Dept. of Microbiol., Sch. of Dent., Aichi Gakuin Univ., <sup>2)</sup> Oral Microbiol. and Immunol. Branch, NIDCR, NIH

to identifying these bacteria based on the arrangement of genes for synthesis of polysaccharide precursors.

Coaggregations of oral viridans group streptococci with other members of the biofilm community, including *Actinomyces* spp. and streptococci, depends on recognition specific host-like motifs within the hexa- and heptasaccharide repeats of different streptococcal receptor polysaccharides (RPS). Seven types of RPS (1Gn, 1G, 2Gn, 2G, 3Gn, 3G, 4Gn and 5Gn) have been identified by structural characterization of these polysaccharides from over 20 different streptococcal strains so far. The repeating unit of RPS invariably contain a disaccharide motif, either GalNAc $\beta$ 1  $\rightarrow$  3Gal (Gn) or Gal $\beta$ 1  $\rightarrow$  3GalNAc (G), both of which are recognized by type II fimbriae of *Actinomyces* spp. In contrast, the streptococcal strains which have Gn-containing polysaccharides also participate in GalNAc-sensitive coaggregations with strains of *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguinis*. Previous studies showed that the genetic loci for biosynthesis of 2Gn RPS in *S. gordonii* were different from those of the other RPS (1Gn, 2G, 3G, 4Gn and 5Gn) in *Streptococcus oralis*, but that those gene clusters in *S. oralis* were located on the same loci. Thus, the gene cluster for type 1Gn RPS in *S. sanguinis* was analyzed and compared with those for RPS synthesis in *S. gordonii* and *S. oralis* to examine whether the difference of the genetic loci for RPS synthesis is species-specific. The *rml* genes for synthesis of dTDP-L-Rha, which is one of RPS precursors, were in *rps* loci of *S. oralis* strains but at other loci in *S. gordonii* and *S. sanguinis*. Genetic loci of two distinct galactose epimerases were also different. The *galE2* gene for epimerization of both UDP-Glc/UDP-Gal and UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc was at a different locus in those three streptococcal species. The findings provide insight into cell surface properties that distinguish different RPS-producing streptococci and open an approach

SS8-4

Microbiota profiling of bronchial fluids of elderly patients

Naoko Ishida<sup>1</sup>, Takushi Sato<sup>1</sup>, Yasushi Hoshikawa<sup>3</sup>, Naoko Tanda<sup>2</sup>, Takashi Kondo<sup>3</sup>, Nobuhiro Takahashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Div. of Oral Ecol. and Biochem., and <sup>2</sup>Div. of Preventive Dent., Tohoku Univ. Grad. Sch. of Dent., <sup>3</sup>Dept. of Thoracic Surgery, Inst. of Dev., Aging, and Cancer, Tohoku Univ.

This study aimed to perform both quantification and identification of bacteria existing in bronchial fluids (BF) of elderly patients, and to evaluate their relationships with impairment of cough and/or swallowing reflexes (CR/SR). Informed consent was obtained from all 10 subjects with pulmonary carcinoma (mean age  $\pm$  standard deviation,  $73.8 \pm 7.3$  years). Before lung resection, the CR was assessed using nebulized citric acid delivered by an ultrasonic nebulizer, and the SR was assessed by bolus injection of distilled water into the pharynx through a nasal catheter. BF from subjects undergoing lung resections, were collected with intratracheal intubation and a micro-sampling probe, and cultured anaerobically on CDC blood agar plates. After seven days, colony-forming units (CFU) were counted, and the colonies were subcultured and identified by 16S rRNA gene sequencing. Six subjects ( $72.2 \pm 5.8$  years) showed impaired SR, while four subjects ( $74.3 \pm 8.7$  years) had normal SR. On the other hand, all subjects had normal CR. The amount of bacteria in the BF of subjects with impaired SR [ $(1.7 \pm 1.7) \times 10^4$ ] was higher than in those with normal SR [ $(1.2 \pm 1.1) \times 10^3$ ]. The bacterial load in each case, although highly diverse, predominantly consisted of *Actinomyces* (47%), *Gemella* (10%), *Streptococcus* (7%), *Rothia* (7%), *Mogibacterium* (5%) and *Campylobacter* (5%) in BF isolates from patients with impaired SR, while BF from those with normal SR mainly consisted of *Streptococcus* (48%) and *Lactobacillus* (45%). These results suggest that BF from elderly patients contains bacteria, most likely derived from the saliva microbiota, and that the phenomenon may likely occur in elderly patients with impairment of SR. This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research (23592791, 24390511, 25462945, 25463237, 25670777, 25861785) from JSPS.

SS8-5

Hydrogen sulfide, methyl mercaptan, and acetaldehyde in oral health care for perioperative patients with pulmonary carcinoma

Naoko Tanda<sup>1</sup>, Naoko Ishida<sup>2</sup>, Yasushi Hoshikawa<sup>3</sup>, Takuichi Sato<sup>2</sup>, Nobuhiro Takahashi<sup>2</sup>, Ryoichi Hosokawa<sup>4</sup>, Takeyoshi Koseki<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Div. of Preventive Dent., Tohoku Univ. Hosp., <sup>2</sup>Div. of Oral Ecol. and Biochem., Tohoku Univ. Grad. Sch. of Dent., <sup>3</sup>Dept. of Thoracic Surgery, Inst. of Dev., Aging and Cancer, Tohoku Univ., <sup>4</sup>Div. of Preventive Dent., Tohoku Univ. Grad. Sch. of Dent.

Importance of oral health care (OHC) for hospitalized patients is widely known. One of the questions to be answered is how oral environment is influenced by the OHC. We analyzed the effect of OHC on gases and oral bacteria of perioperative patients with pulmonary carcinoma. Seven hospitalized patients with pulmonary carcinoma (4 men, 3 women, mean age 73.4 years) agreed with the research. Hydrogen sulfide, methyl mercaptan, and acetaldehyde in breath and in mouth air of the patients were measured by portable gas chromatographs before breakfast on T1 (before OHC), T2 (after OHC but before pulmonary surgery), and T3 (1 week after pulmonary surgery) in Tohoku University Hospital. Saliva was collected through chewing a paraffin pellet just after measuring gases. The collected saliva was analyzed for oral bacteria by selective Mitis Salivarius (MS) and non-selective CDC blood agar (CDC) under anaerobic and aerobic conditions. The ratio of colony-forming units on the MS to those on the CDC was calculated. Hydrogen sulfide, methyl mercaptan, and acetaldehyde were observed only in mouth air. Acetaldehyde was observed in 6 patients on T1 and disappeared in 5 patients on T2. Hydrogen sulfide was observed in 5 patients on T1 and decreased in 4 patients on T2. Methyl mercaptan was observed in 4 patients on T1 and disappeared on T2. The ratio of MS/CDC under anaerobic condition was highest on T2 in 6 patients. The OHC for perioperative patients with pulmonary carcinoma

decreased odorous gasses in mouth air and increased the ratio of salivary streptococci, usually known as healthy-associated bacteria. This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research (23593083) from JSPS.

SS8-6

Ameriolating effects of a Kampo Medicine, Juzentaihoto on restraint stress and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss

Orie Takeda<sup>1)</sup>, Toshizo Toyama<sup>2)</sup>, Kiyoko Watanabe<sup>2)</sup>, Takenori Sato<sup>2)</sup>, Kenichi Sasaguri<sup>1)</sup>, Susumu Akimoto<sup>1)</sup>, Sadao Sato<sup>1)</sup>, Toshitsugu Kawata<sup>1)</sup> and Nobushiro Hamada<sup>2)</sup>

Div. Oral Science, Dept. Ortho, Kanagawa Dent. Univ.<sup>1)</sup>, Dept of Microbiol, Kanagawa Dent. Univ.<sup>2)</sup>

Microbial dental biofilm is considered the main etiological agent for the initiation of the inflammation process and accompanied by inflammation of the gingiva and destruction of periodontal tissues, leading to alveolar bone loss. The progression and severity of disease may be associated with assorted conditions, especially when a patient is exposed to one or more risk factors known to influence the host response. With respect to possible factors influencing periodontal disease, evidence is emerging that chronic stress, depression and anxiety may negatively influence disease progression.

Juzentaihoto (JTX) is one of the Kampo medicines that consists of 10 herbs. Currently, JTX is widely prescribed for the treatment of anemia, rheumatoid arthritis, vulnerability to illness, fatigue, and inflammatory bowel diseases. The purpose of this study was to investigate the possibility of JTX as a preventive and therapeutic drug for periodontal bone resorption exacerbated by restraint stress.

A rat model of *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss was used to assess the efficacy of JTX as a stress-reducing agent. In order to evaluate the effect of JTX against restraint stress and *P. gingivalis* infection, we have determined the differences in alveolar bone loss among the experimental groups. The concentrations of adrenocorticotrophic hormones were measured as stress markers, and weights of the thymus and spleen were evaluated. To clarify the mechanism of the inhibitory effects of JTX on alveolar bone resorption, JTX was added to cultured mouse bone marrow cells prone to differentiate into osteoclasts. Administration of 10 mg/ml JTX with *P. gingivalis* infection and restraint stress rats significantly reduced alveolar

bone loss compared to the combination of *P. gingivalis* infection and restraint stress rats. Our findings suggest that JTX has a potent inhibitory effect on stress and osteoclast genesis, and it may be used as a therapeutic drug in the treatment of periodontal disease.

SS8-7

Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 in *P. gingivalis*-induced inflammation

Cintia Yuki Fukuoka<sup>1)</sup>, Ujjal K Bhawal<sup>1)</sup>, Ryoki Kobayashi<sup>1)</sup>, Toshizo Toyama<sup>2)</sup>, Takenori Sato<sup>2)</sup>, Hidefumi Kumada<sup>2)</sup>, Yoshimitsu Abiko<sup>1)</sup>, Nobushiro Hamada<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Dept. of Biochem. and Molecular Biol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, <sup>2)</sup> Dept. of Microbiol., Kanagawa Dent. Univ.

Inflammation is a process dependent on the coordinated regulation of numerous genes. Transcription factors play a key role in this process, representing often the most important contribution to cellular function regulation and response to inflammation. New evidences suggest that inflammatory stimuli can activate the hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) and its associated genes, DEC1 and DEC2. The differentiated embryonic chondrocyte gene 1 (DEC1) and its structurally related protein, DEC2 are basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors, direct targets of HIF-1 alpha, regulators of circadian mammalian molecular clock. This study aimed to investigate the expression of DEC1, DEC2 in gingival inflammation.

Human gingival primary epithelial and fibroblasts cells were pre-treated with LY294002, a pharmacological inhibitor of PI-3K, followed by IL-1 beta (10 ng/ml) for 24 h. Total RNA was extracted, converted to cDNA and subjected to real-time RT-PCR to investigate the gene expression of DEC1 and DEC2. The cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) targeting Akt and negative control. Western blotting was used to verify the expression changes on DEC1, DEC2 and HIF1-alpha in the cells lysate. A mouse model of experimental periodontitis was induced in wild type, DEC1KO and DEC2KO mice by *Porphyromonas gingivalis*, and they were sacrificed 1 month after infection. Micro CT analysis of alveolar bone was performed. Horizontal alveolar bone loss was measured by the distance between the cemento-enamel junction and the alveolar bone crest. Upper jaw specimens were stained with hematoxylin-eosin and immunohistochemistry analyzed for HIF-



1 alpha, DEC1, TNF-alpha and IL-1beta protein expression. The immune response in gingival tissues was also examined by flow cytometry.

Our findings showed that IL-1beta up-regulates DEC1 in human primary gingival cells. This regulation occurred though the inflammatory signaling pathway via Akt. Significant induction of CD11b + F4/80 + macrophage cells was detected in inflamed gingiva of DEC2KO mice. RANKL expressing CD4 + T cells were also predominantly present in these mice.

Taken together, these data suggested that DEC1 and DEC2 play an important role in *P. gingivalis*-induced inflammation.

SS9-1

骨芽細胞分化と骨再生における CCN3 の役割

山口 朗

東医歯大 院医歯 口腔病理

我々はマウス骨再生モデルにおける遺伝子発現の網羅的解析により、CCN3の発現が骨再生の初期で上昇することを見いだした。そのため、我々は骨芽細胞分化と骨再生におけるCCN3の役割を解析してきた。まず、骨芽細胞様培養細胞を用いた実験や移植実験で、CCN3はBMP-2結合してBMPのシグナルを抑制するとともに、Notchに結合してそのシグナルを促進することにより、最終的に骨芽細胞分化を抑制することを明らかにした(BBRC 354:567,2007, BBRC 368:808,2008)。つまり、CCN3は骨芽細胞の分化過程で、BMP-2のantagonistであるとともに、Notchの受容体としても作用すると考えられた。さらに、骨再生過程におけるCCN3の役割を明らかにするために、2.3 kb *Coll1a1* promoterを用いた *Ccn3* transgenic (*Ccn3* Tg) マウス及び *Ccn3* knockout (*Ccn3* KO)マウスを用いた実験を行った。その結果、*Ccn3* Tgマウスの骨格では、骨形態計測法で野生型マウスの骨格に比べ、骨量が減少していたが、*Ccn3* KOマウスの骨量は野生型と差がなかった。また、*Ccn3* Tgマウスの骨再生は野生型と変化がなかったが、*Ccn3* KOマウスの骨再生は野生型マウスより亢進していた。さらに、*Ccn3* KOマウスの骨再生過程では、野生型マウスに比べて骨芽細胞分化に関連する遺伝子の発現が骨再生初期で上昇していた。骨再生初期におけるSmad1/5のリン酸化、核移行は、*Ccn3* KOマウスの方が野生型マウスに比べて促進していた(JBC, in press)。これらの結果より、CCN3は骨芽細胞分化及び骨再生を抑制する因子であると考えられた。

## SS9-2

軟骨特異的 CCN3 過剰発現による内軟骨性骨形成の修飾

服部 高子<sup>1)</sup>、大野 充昭<sup>2)</sup>、星島 光博<sup>1)</sup>、角谷 宏一<sup>3)</sup>、桑原 実穂<sup>3)</sup>、三宅 佳子<sup>1)</sup>、窪木 拓男<sup>2)</sup>、滝川 正春<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>岡大 院医歯薬 口腔生化、<sup>2)</sup>岡大 院医歯薬 インプラント再生補綴、<sup>3)</sup>岡大 歯

CCN3 のドメインの一つを欠失した遺伝子改変マウスの解析から、骨格の正常な発育における CCN3 の重要性が示唆されるが、これまで明確な内軟骨性骨形成へ CCN3 の関与を示した報告は無い。そこで我々は、内軟骨性骨形成における CCN3 の役割を解明するために、軟骨組織特異的に CCN3 を過剰発現するマウスを作製し、表現型の解析を行った。Col2a1 promoter 下流に GFP 融合 mouse CCN3 遺伝子を接続したトランスジェニックマウスを作製し、軟骨組織特異的 CCN3 過剰発現を得た。胎生 15.5 および 18.5 日齢の CCN3<sup>Col2a1tg</sup>マウスの長管骨は、骨化部分が太く短く、成体長管骨はマイクロ CT 解析から、骨体積、骨密度、骨梁数などの著しい低下が観察された。また、CCN3<sup>Col2a1tg</sup>長管骨の *in situ* hybridization で、軟骨分化の遅延が観察され、骨芽細胞におけるマーカー遺伝子の発現も抑制されていた。軟骨内への血管侵入が抑制されていることが、抗 CD31 抗体を用いた蛍光免疫染色で観察された。胎生 18.5 日齢の CCN3<sup>Col2a1tg</sup>長管骨切片で海綿骨の骨梁形成が抑制されており、海綿骨内 TRAP 陽性細胞の減少がみられたが、一方で軟骨-骨境界部における陽性細胞数は増加していた。さらに胎生 10.5 日齢の CCN3<sup>Col2a1tg</sup>肢芽原基の未分化間葉系細胞を用いた高密度培養から、CCN3 の過剰発現は軟骨細胞への分化が促進されていることが明らかとなった。これらの結果より、軟骨組織における CCN3 の過剰発現は、軟骨への分化を促進する一方で、内軟骨性骨形成の最終段階である軟骨から骨への転化を遅延させ、血管侵入を阻害する結果、著しい骨梁形成の低下を誘発することが明らかとなった。

## SS9-3

ERK1/2 経路を介した CCN3 の初期軟骨分化における作用の検討

川木 晴美<sup>1)</sup>、久保田 聡<sup>2)</sup>、尾上 一平<sup>1,3)</sup>、近藤 雄三<sup>1,3)</sup>、高橋 潤<sup>1,3)</sup>、神谷 真子<sup>1)</sup>、高山 英次<sup>1)</sup>、近藤 信夫<sup>1)</sup>、滝川 正春<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>朝日大 歯 口腔生化、<sup>2)</sup>岡山大 院医歯薬 口腔生化、<sup>3)</sup>朝日大 歯 インプラント

CCN ファミリーは共通構造をもつ多機能分泌タンパク質群であり、一部のメンバーが骨形成に重要な因子であると示唆されている。我々はマウス肋軟骨由来の軟骨細胞を用いた解析から、CCN3 が軟骨では細胞増殖と分化をメンバー中で唯一抑制する機能を示すことを報告してきた。一方で、CCN3 はメンバー中では四肢発生の最も早期に発現していることを見出し、内軟骨性骨化過程の調節に寄与する因子であることを報告してきた。そこで本研究では、四肢発生初期の軟骨形成期に他のメンバーに先駆けて発現する CCN3 の機能を解析した。胎生 11.5 日のマウス肢芽を酵素処理して得た細胞に、リコンビナント CCN3 あるいは CCN3 をターゲットとする siRNA を添加し増殖・分化について検討した。その結果、CCN3 は肋軟骨由来の軟骨細胞では増殖とプロテオグリカン合成、長期培養後の石灰化を抑制するのに対し、肢芽由来の細胞では増殖の促進、およびアグリカンの mRNA 発現促進、プロテオグリカン合成を促進した。さらにこれらを誘導する経路について、ERK1/2 の経路を阻害する U0126 および p38MAPK 経路を阻害する SB203580 を用いて検討した結果、CCN3 の肢芽由来細胞の増殖促進効果に ERK1/2 経路が関与していることを見出した。以上より、軟骨の初期分化過程では、CCN3 は細胞増殖・分化を促進し四肢発生に貢献していることが示唆された。(会員外共同研究者：Nouredine Lazar and Prof. Bernard Perbal)

SS9-4

牽引力は CTGF シグナルを介して頭蓋縫合における血管形成を促進する  
 竹下 信郎、長谷川正和、佐々木紀代、  
 関 大輔、宮下 俊郎、高野 郁子、  
 宮島 悠旗、山本 照子  
 東北大学 歯 顎口腔矯正

縫合は頭蓋顔面の骨と骨を結合する線維性組織で、頭蓋顔面骨格の成長中心として知られる。また縫合は、頭蓋顔面に負荷される機械的刺激を受容する役割を持ち、矯正歯科治療では顎整形力を縫合に作用させ、成長期患者の骨格性不調和の改善を図る。しかし、機械的刺激が縫合の細胞動態や遺伝子発現に及ぼす影響の全容は明らかではない。本研究では、牽引力に対する縫合の初期反応として、血管形成に着目して解析を行った。6週齢 ICR マウスの頭頂骨にスプリングを装着し、矢状縫合に 20 g の牽引力を 0、3、および 12 時間負荷した。その後、矢状縫合における STRO-1 陽性細胞および ERK と pERK の発現を免疫染色にて解析した。また、間葉系幹細胞および骨芽細胞マーカーと血管形成関連因子の mRNA 発現をリアルタイム PCR により解析した。矢状縫合において STRO-1 陽性細胞、CD44、および CD73 の発現が認められたが、牽引力負荷後 12 時間にそれらの発現は減少した。骨芽細胞マーカーである Runx2 および osteocalcin の発現は、牽引力負荷後 12 時間の間に経時的に減少した。VEGF および内皮細胞マーカーの発現は、3 時間で上昇した。CTGF 発現もまた 3 時間で上昇し、さらに CTGF 中和抗体は牽引力による VEGF 発現の上昇を抑制した。縫合の細胞における pERK の核内移行が 3 時間で認められ、また ERK および JNK の阻害剤は、牽引力による CTGF および VEGF 発現の上昇を、それぞれ部分的に抑制した。本研究により、牽引力に対する縫合の初期反応において、血管形成が誘導されることが示された。この血管形成は CTGF により制御され、また MAPK も部分的な制御に関与することが示唆された。さらに、縫合における間葉系幹細胞の存在が初めて示され、牽引力による内皮細胞発現の亢進に関与することが推察される。

SS9-5

CCN2 は軟骨細胞のエネルギー代謝に重要である  
 前田 彩<sup>1,2)</sup>、久保田 聡<sup>1)</sup>、川木 晴美<sup>1)</sup>、河田かずみ<sup>1)</sup>、三宅 由晃<sup>3)</sup>、服部高子<sup>1)</sup>、西田 崇<sup>1)</sup>、森谷 徳文<sup>2)</sup>、飯田 征二<sup>2)</sup>、滝川 正春<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>岡大 院医歯薬 口腔生化、<sup>2)</sup>岡大 院医歯薬 顎口腔再建外科、<sup>3)</sup>岡大 院医歯薬 整形外科

**【目的】** CCN ファミリーの代表的メンバーである CCN2 は細胞外シグナルネットワークを指揮し、間葉系組織の発生や再生に重要となる分子である。この多彩な作用をもつ CCN2 の欠損したマウスの骨芽細胞・軟骨細胞では、細胞増殖能、細胞外基質産生能が著しく低下する。これらは、CCN2 が軟骨代謝の根幹に関与していることを示唆している。そこで我々は、CCN2 の代謝全般における役割を解明することを目的として解析をすすめた。

**【方法】** 野生型マウスと CCN2 欠損マウスの胎児成長板軟骨切片に対して軟骨基質染色を行った。次に、同マウス肋軟骨より軟骨細胞を採取し、メタボローム解析を行った。また、ATP bioluminescence assay を用い細胞内 ATP 量を計測した。さらに、同細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイにより mRNA 発現プロファイルを解析した。そしてそれにより同定されたエネルギー代謝関連遺伝子産物の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。

**【結果】** 軟骨基質染色では、野生型と比較して CCN2 欠損マウスで基質蓄積量の低下が確認された。CCN2 欠損が基本代謝動態に与える影響の全容を解明すべく行ったメタボローム解析では、エネルギー合成に関わる ATP をはじめとした多くの代謝産物の定量値が、野生型と比較し、CCN2 欠損軟骨細胞で低値となった。そしてその原因を探るべく行った DNA マイクロアレイの結果では、ATP 産生に関わるいくつかの遺伝子に発現の低下がみられた。そのうち、解糖酵素のひとつをコードする enolase1 遺伝子の発現が、野生型マウスより CCN2 欠損マウスから分離した軟骨細胞において低下していることがリアルタイム PCR 法によって再現された。以上より、CCN2 は軟骨細胞のエネルギー代謝において重要な因子であることが示唆された。(本研究は UCLA の Karen M. Lyons 博士との共同研究である。)

SS9-6

CTGF/CCN2 が未分化なヒト歯根膜細胞株の骨芽細胞様分化に及ぼす影響  
 祐田 明香<sup>1)</sup>、前田 英史<sup>2)</sup>、藤井 慎介<sup>3)</sup>、門野内 聡<sup>1)</sup>、山本 直秀<sup>1)</sup>、和田 尚久<sup>2)</sup>、友清 淳<sup>4)</sup>、郡 勝明<sup>2)</sup>、濱野 さゆり<sup>1)</sup>、赤峰 昭文<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>九大 院歯 歯科保存、<sup>2)</sup>九大 病院 歯内治療、<sup>3)</sup>阪大 院医 分子病態生 化、<sup>4)</sup>Colgate Australian Clinical Dent. Res. Centre, Sch. of Dent., Univ. of Adelaide

歯根膜細胞は恒常的に CTGF を発現し、さらにその発現は機械的刺激によって発現が調整されていることが示唆された。一方、CTGF 刺激は 1-11 細胞株の細胞増殖能、および遊走能を促進し、さらに骨芽細胞誘導培地への添加により骨関連遺伝子発現が上昇し、ALP 活性、ならびに Alizarin red 陽性反応が促進した。したがって CTGF は未分化な歯根膜細胞の増殖および遊走を亢進し、さらに骨芽細胞様分化を促進する可能性が示唆された。

[目的] Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) は、増殖、運動、分化促進など多様な生物学的活性を持つタンパク質であることが知られている。近年、歯根膜細胞に関しては、機械的刺激によって CTGF の遺伝子発現が促進し (Saminathan *et al.*, 2012)、また骨髄間葉系幹細胞は、CTGF 刺激によって骨芽細胞分化が促進することが報告されている (Wang *et al.*, 2009)。しかしながら、CTGF が未分化な歯根膜細胞に及ぼす影響に関しては十分な解析はなされていない。そこで本研究では、歯根膜組織における CTGF の発現と CTGF が未分化なヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化に及ぼす影響について解析した。

[材料および方法] (1) 5 週齢雄性 SD ラットの上顎白歯の組織切片、および矯正治療のため抜歯を希望して本院を受診した患者 (25 歳女性及び 23 歳男性) より歯根膜組織を採取し、3-5 継代培養した細胞 (HPDLC) を用いて、抗 CTGF 抗体による免疫組織細胞学的染色を行った。なお本研究は九州大学大学院歯学研究院倫理委員会規定の認可を得て患者の同意の上で行われた。(2) 細胞伸展器 (STB-140, STREX 社) を用いて伸展力を負荷した HPDLC における CTGF 遺伝子発現を、定量的 RT-PCR 法にて解析を行った。(3) 当研究室にて樹立した未分化なヒト歯根膜細胞株 (1-11 細胞株: Fujii *et al.*, 2008) に、CTGF を添加し培養後、細胞増殖能、および遊走能について解析を行った。(4) 1-11 細胞株を、CTGF を添加した骨芽細胞誘導培地にて培養後、定量的 RT-PCR 法にて骨関連遺伝子の発現解析、Alkaline phosphatase (ALP) 活性の解析、さらに Alizarin red 染色を行った。

[結果および考察] 免疫組織細胞学的染色を行った結果、ラットの歯根膜組織そして HPDLC において CTGF の陽性反応が認められた。また 8% の伸展率で伸展力を 1 時間負荷した HPDLC において、CTGF の遺伝子発現が上昇した。以上のことから、



SS9-7

全身性誘導性 CCN2 ノックアウトマウスにおける抗糸球体基底膜腎炎の糸球体障害軽減機序の検討

横井 秀基<sup>1)</sup>、戸田 尚宏<sup>1)</sup>、笠原 正登<sup>1)</sup>、森 潔<sup>1,2)</sup>、栗原 孝成<sup>1)</sup>、今牧 博貴<sup>1)</sup>、石井 輝<sup>1)</sup>、古賀 健一<sup>1)</sup>、森 慶太<sup>1)</sup>、加藤有希子<sup>1)</sup>、大野 祥子<sup>1)</sup>、菅原 照<sup>3)</sup>、松阪 泰二<sup>4)</sup>、中尾 一和<sup>1,2)</sup>、向山 政志<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>京大 院医 内分泌代謝内科、<sup>2)</sup>京大院医 メディカルイノベーションセ、<sup>3)</sup>大阪赤十字病院 腎臓内科、<sup>4)</sup>東海大 腎内分泌代謝内科

【背景】CCN2 は他の増殖因子シグナルを制御し線維化を促す。CCN2 ノックアウトマウスは生後間もなく呼吸不全にて死亡するため、腎疾患における検討は十分になされていない。今回、我々は誘導性全身性 CCN2 ノックアウト (Rosa-CCN2 cKO) マウスを作製し、抗糸球体基底膜 (GBM) 腎炎における CCN2 抑制の意義を検討した。

【方法】CCN2 floxed (fl/fl) マウスと RosaCreER<sup>T2</sup> マウスを交配させ、タモキシフェン誘導性に全身で CCN2 をノックアウトする Rosa-CCN2 cKO マウスを作製した。Rosa-CCN2 cKO マウスは3週齢で4-hydroxytamoxifen (4-OHT) を投与した。抗糸球体基底膜 (抗 GBM) 腎炎をマウスに惹起し、28日目での腎障害について検討を行った。また、糸球体障害に及ぼす機序を検討するために、ポドサイト特異的 CCN2 cKO マウス (pod-CCN2 cKO) も作製した。

【結果】Rosa-CCN2 cKO マウスの腎臓は正常な組織像を示し、尿中アルブミン排泄も増加を認めなかった。抗 GBM 腎炎を惹起すると、コントロールマウスでは多量の蛋白尿に加えメサンギウム基質増加や半月体形成などの糸球体障害をみとめた。Rosa-CCN2 cKO マウスでは7日目に尿蛋白半減を認め、組織変化も軽減していた。また、増加した糸球体内 MAC2 陽性細胞数も減少しており、糸球体での TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ SMA, Fibronectin, colla1, F4/80 の mRNA 発現の増加が Rosa-CTGF cKO マウスで軽減していた。一方 pod-CCN2 cKO マウスではこれらの改善はみられなかった。

【結論】抗 GBM 腎炎においてポドサイトではなく全身性に CCN2 を抑制することで尿蛋白や糸球体障害を軽減することができ、CCN2 は抗 GBM 腎炎において重要な役割を担うことが示唆された。

SS10-1

*P. gingivalis* の歯周組織破壊戦略—変貌する歯周病因論—

天野 敦雄

阪大 院歯 口腔分子免疫制御 予防歯科

2001年、人類史を俯瞰するギネスブックに『全世界で最も蔓延している病気は歯周病である。地球上を見渡してもこの病気に冒されていない人間は数えるほどしかいない』と記載された。この強大な敵に挑み、人々を守っている我々は美しい存在ではないかと誇らしい気もする。しかし、歯周病の全体像は判っていない。病因論が確立していないのだから、歯周治療論も百家争鳴となって然るべしである。

1998年にバイオフィルム細菌は秘密戦隊ゴレンジャーのように5つのグループに色分けされた。Yellow、Green、Orange、PurpleそしてRedである(後にBlueが加わり、ロクレンジャーになってしまった)。ゴレンジャーではRedが主役である。歯周炎でもRedが主役だ。悪玉3バイ菌にRed complexの称号が与えられた。この中でも特に病原性が高い *Porphyromonas gingivalis* (Pg菌) は、小中学校生の口腔内からは検出されない。しかし、思春期以降は50%以上の頻度で検出されるようになる。

プラークの病原性は、Red complexの中で最も病原性の強いPg菌の菌量、そしてPg菌の遺伝子型で決まる。Pg菌は強力な歯周毒性をもっているが、弱点は多い。血液中の鉄分(ヘモグロビン)とタンパク質が増殖に必須、酸素や酸性環境は苦手だ。歯周局所環境の変化をきっかけに歯肉溝内面に潰瘍が形成され、毛細血管が歯肉縁下プラークに暴露された時、ふんだんに供給される血液を得て、Pg菌は大いに増殖し、プラークの病原性は一気に高まる。これが歯周炎発症の瞬間だ。Pg菌は上皮細胞に侵入し、ポケット内潰瘍面の修復を阻害し、血液供給が絶たれないように画策し、歯周炎を持続させる

Pg菌は歯周細胞を自由に行き来し、歯周組織内で生息を続ける。この細菌を完全に駆逐するのは極めて困難である。感染源を除去できない感染症には、再発が付きものである。歯周炎との戦いに終わりは無い。

SS10-2

細菌プロテアーゼ：多才な病原因子  
 今村 隆寿  
 熊本大 院生命科学 分子病理

細菌は様々な病原因子を産生・放出するが、細菌プロテアーゼは組織破壊だけでなく宿主の種々のタンパク質に作用して病原性を発揮する多才な病原因子として近年認識されてきている。細菌プロテアーゼの病原因子としての機能は少なくとも炎症誘導と宿主防御機構の修飾の2つの方向性がみられる。前者として、まず炎症の初期現象で感染巣の浮腫・腫脹をおこす血漿漏出の誘導がある。これには、血漿カリクレイン・キニン系の活性化を介したキニン遊離や、補体 C5 からのアナフィラトキシン C5a 放出による肥満細胞からのヒスタミン遊離が関与する。続いて起こる白血球浸潤は C5a 放出や種々の細胞からのケモカイン分泌によって引き起される。このような機構によって細菌感染による炎症を増大させる。後者として、細菌プロテアーゼは C5a やケモカインを分解し、さらにその受容体をも破壊する。これにより白血球動員を抑制して宿主防御機構による攻撃からの細菌の逃避を助長し細菌の感染持続に貢献する。このようにして、細菌プロテアーゼは感染症を悪化させている。それゆえ、細菌プロテアーゼを抑制する特異的なインヒビターは感染症治療薬として有望である。細菌プロテアーゼに対する内因性インヒビターは唯一  $\alpha_2$ -マクログロブリンであるが、我々は細菌プロテアーゼの  $\alpha_2$ -マクログロブリンによる抑制からの新たな回避作用を見出した。これにより、細菌プロテアーゼはより長く病原作用を発揮できる。本発表では2種類の黄色ブドウ球菌スタホパインによる協同的キニン遊離作用、エロモナス菌 ASP による C5a 放出および  $\alpha_2$ -マクログロブリン回避作用、ジンジバリス菌ジンジパインによる歯髄細胞からの神経ペプチド分泌誘導など細菌プロテアーゼの多才な機能を解説する。また、トピックとしてシトルリン化タンパク質産生による関節リウマチ発症へのジンジバリス菌の関与、細胞内感染による細胞初期化を紹介したい。

SS10-3

ジンジパインの分泌機構  
 才木桂太郎、古西 清司  
 日歯大 生命菌 微生物

慢性歯周炎の起因菌である *Porphyromonas gingivalis* は、ヒト歯肉溝に定着するグラム陰性の偏性嫌気性細菌である。*P. gingivalis* は種々のプロテアーゼを分泌して、本菌が定着している歯肉溝に存在するタンパク質を分解する。糖をエネルギー源として利用できない非糖分解性の *P. gingivalis* は、分泌プロテアーゼによる消化ペプチド断片を菌体内に取り込んで代謝・増殖する。このタンパク質の分解反応はタンパク質の菌体外消化に相当する反応であり、エンドサイトーシス等のバルクの取り込み系が無い本菌には必須の過程と考えられる。この菌体外消化反応において最も重要であるプロテアーゼは、トリプシン様の活性を示すジンジパインである。一方、ジンジパインによるタンパク質の分解反応を組織タンパク質の破壊反応と見なすと、病原因子としてのジンジパインも理解できる。ジンジパインによる「菌体外消化」と「組織タンパクの破壊」は何れも、ジンジパインが菌体外に分泌されて初めて起こる反応であるので、ジンジパインの分泌機構の解明は重要な研究テーマである。この研究は膜タンパク質を扱うために実験系の構築が難しく、進展も決して早いとは言えない。しかし近年いくつかの重要な発見がなされ、このタンパク質分泌系の全体像がある程度明らかにされてきた。ジンジパイン等の分泌タンパク質の C 末端領域には保存性配列 CTD (C-terminal domain) が見出されており、CTD がシグナル配列として機能することで CTD 依存的にタンパク分泌装置 PorSS によっては外膜を透過するモデルが提唱された。一方で分泌タンパクのプロセッシングや分泌過程に関与していると思われる翻訳後修飾反応も見いだされた。PG26 タンパクによる CTD の切断と、PG27 タンパクが関与する A-LPS (deacylated anionic LPS) による糖鎖修飾である。これらの翻訳後修飾過程について、演者が初めて同定報告した PG27 タンパクの研究成果を中心に考察する。

SS10-4

ジンジパインによる骨破壊分子メカニ  
 ズムの解明  
 宮本 洋一  
 昭大 歯 口腔生化

歯周病は、歯槽骨に炎症性骨破壊が起こる代表的な口腔感染症である。*Porphyromonas gingivalis* をはじめとする歯周病原菌が歯周ポケットに感染することで歯周組織に慢性炎症が起こり、歯槽骨が破壊される。歯槽骨の吸収を担う破骨細胞の分化は、骨芽細胞膜上のRANKLと単球・マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞膜上のRANKの会合により誘導される。一方、骨芽細胞が分泌するオステオプロテゲリン(OPG)は、RANKLのおとり受容体で、RANKLとRANKの会合を阻害し、破骨細胞分化を抑制する。生理的骨吸収因子や歯周病原菌の菌体成分や炎症性サイトカインなどの炎症性骨吸収因子は、RANKL/OPG発現比を上昇させることで、破骨細胞分化を促進する。

タンパク質分解酵素ジンジパインは、*P. gingivalis* が産生する主要な病原因子で、組織破壊などに深く関わっている。Okahashiらは、骨芽細胞における*P. gingivalis* 感染に伴うRANKLの発現にジンジパインが関与することを示唆した (Infect Immun 72: 1706-1714, 2004)。Pathiranaらは、ジンジパインをコードする*rgpA*、*rgpB*、*kgp*の3遺伝子の欠損株をマウス口腔内に感染させる歯周病モデルを用いて、KgpとRgpBが歯槽骨吸収に関与し、RgpAの関与は小さいと報告した (Infect Immun 75: 1436-1442, 2007)。

我々は、マウス骨芽細胞・骨髄細胞共存培養における破骨細胞分化に対する精製KgpおよびRgpBの影響を解析した。RgpBは、破骨細胞分化に影響を及ぼさなかったが、Kgpは、OPGを分解することで、活性型ビタミンDおよびLPSによる破骨細胞分化を促進した (Biochem J 419: 159-166, 2009)。また、Kgpは、TNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ による破骨細胞分化も促進したが、IL-17Aによるそれを抑制した。TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ はKgpによる分解に対して、OPGより安定なのに対し、IL-17Aは、OPG同様、Kgpによって効率よく分解されたことが、原因のひとつと考えられる。これらの結果は、KgpによるOPGの分解・不活性化が歯周病に伴う歯槽骨破壊の要因のひとつであることを示唆している。

SS10-5

*Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛の構造・構築機序に関する最近の知見—*mfa1* 遺伝子の下流因子の役割—  
 長谷川義明、村上 幸孝  
 朝日大 歯 口腔感染医療 口腔微生物

歯周病関連菌 *Porphyromonas gingivalis* は菌体表面に FimA 線毛と Mfa1 線毛の二種の線毛を菌体表面層に発現している。線毛は、本菌の病原性発現、特に歯肉上皮細胞への付着やバイオフィーム形成に重要な役割を演じていることが明らかになっている。FimA 線毛は、基礎研究で汎用される *P. gingivalis* ATCC 33277 株においては、1  $\mu\text{m}$  以上におよぶ直鎖状のファイバーとして観察される。近年、*fimA* 遺伝子のすぐ下流に位置する *fimB* 遺伝子にナンセンス変異が見出され、*fimB* 回復株では 150 nm 程度の短い FimA 線毛が観察されることから、長さの制御に関わることが示された。また *fimB* 遺伝子の下流に位置する 3 つ遺伝子からの転写産物である FimC、FimD 及び FimE タンパク質が FimA 線毛の付随成分として同定された。一方、短線毛とも呼ばれる長さの平均が 100 nm 程度の Mfa1 線毛では、主要成分をコードする *mfa1* 遺伝子のすぐ下流に位置する *mfa2* 遺伝子が Mfa1 線毛の長さの制御と膜へのアンカーとして機能することが示された。さらに、*mfa2* 遺伝子の下流に位置する 3 つの遺伝子からの転写産物である PGN0289 (Mfa3)、PGN0290 及び PGN0291 タンパク質が、Mfa1 線毛の付随成分として同定された。このように線毛因子をコードする遺伝子の構造において、二種の線毛間での共通性が認められているが、付随成分の局在とそれらの構築機序は不明である。

近年、我々は *mfa2* 遺伝子の下流に位置する因子の解析をすすめ、Mfa3 が線毛の先端に局在していること、Mfa3 が PGN0290 及び PGN0291 タンパク質の線毛へのアセンブリに関与する可能性を見出した。そこで、本シンポジウムでは、私たちの最新の知見をもとに、今まで理解されていなかった Mfa1 線毛の構造と構築機序について紹介したい。



SS11-1

口腔粘膜における痛み感受性チャネルの局在と機能  
城戸 瑞穂  
九大 院歯 分子口腔解剖

口腔は鋭敏な部位として知られている。痛みを含むポリモーダルな受容の基盤となる末梢神経は口腔粘膜に密に分布しているが、その分布は一様ではなく、部位により異なっている。マウス・ラットを対象として末梢神経と上皮組織との関連を形態学的に観察してきた成果を供覧し、その化学的神経機能を考察する。

唐辛子の辛味成分であるカプサイシンは、侵害受容ニューロンを特異的に活性化させることが知られている。そのカプサイシンの受容体である陽イオンチャネル TRPV1 (transient receptor potential channel vanilloid subtype 1) は、カプサイシンのみならず酸や侵害熱により活性化すること、さらに TRPV1 遺伝子欠失マウスにて炎症性疼痛が抑制されたことから、TRPV1 は痛みの中心的な分子として、痛み緩和の創薬ターゲットとなっている。この TRPV1 陽性神経は歯肉・舌など口腔粘膜に密に分布していた。さらに、上皮細胞にもこの TRPV1 が発現しており、TRPV1 陽性の上皮領域には他の部位より密な神経支配が認められた。またカプサイシン刺激により、口腔粘膜および三叉神経節においてリン酸化 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 陽性の神経が増加していた。こうしたことから、カプサイシン感受性の神経が口腔内に密に分布し痛みに関わっていることが示唆された。ヒトのカプサイシン感受性に関わる TRPV1 についての研究成果も紹介する予定であり、痛み緩和に向けた研究の参考になれば幸いである。

SS11-2

口腔内疼痛の疾患別特徴  
小見山 道  
日大 松戸歯 顎口腔機能治療

最も多くの人を経験している顔面領域の激しい痛みは、歯痛であり、歯科診療において一般的に取り扱う痛みのほとんどが歯原性歯痛である。その原因は、う蝕および根尖性歯周炎、歯周疾患（辺縁性歯周炎）、そして歯の破折といった外傷によるところが主となる。近年、歯痛に関して、旧来の歯科的対応では解決できず、原因不明のまま長期間の経過をたどる非歯原性歯痛の症例が多く報告されている。

頭頸部のすべての深部痛は、歯痛として感じられる関連痛を生じさせる可能性があるが、そのなかでも、咀嚼筋の筋・筋膜痛からの痛みが最も多い。特に咬筋の筋・筋膜痛からくる同側下顎臼歯部への関連痛と、側頭筋からくる同側上顎小臼歯、大臼歯への関連痛が高頻度に認められる。痛みは非拍動性で持続的であり、咀嚼筋の触診で痛みを再現する。さらに当該歯への麻酔診で反応しないが、当該筋への局所麻酔による歯の痛みの減弱で確定される。

反復発作性神経痛の一つである三叉神経痛は、顔面領域への触刺激で誘発されることが多いが、口腔内への刺激でも誘発される、あるいは歯へ放射される場合がある。いずれの場合でも、突発的で、鋭く、自発性の痛みとして特徴づけられる発作性神経痛の痛みである。しばしば歯への局所麻酔によって疼痛発作を緩解させうることから、歯髄疾患と誤診することがあり注意が必要である。

また、口腔粘膜の灼熱感、特に舌の灼熱感は、慢性鉄欠乏性貧血のような全身疾患によって生じる。これらは通常舌の糸状乳頭や乳頭萎縮性の変化を伴う。しかしながら、口腔内や舌に灼熱感を訴える50~70歳の女性患者において、多くの場合、口腔内に原因となる変化を認めない。これらは舌痛症と呼ばれ、その原因は多岐にわたる。

今回このような、口腔内の多様な疼痛性疾患に関して、症例を供覧しつつ問題点を提示することで、基礎と臨床をつなぐ有意義な議論となれば幸甚である。



SS11-3

舌痛症における Artemin の役割

篠田 雅路

日大 歯 生理

舌痛症は、舌に炎症や腫瘍などの器質的な変化、血液学のおよび神経学的異常が認められないにもかかわらず「ヒリヒリ」「ピリピリ」した痛みや灼熱感といった舌痛覚異常を生じる疾患である。女性に発症することが多く、痛む部位が移動する、食事中は痛みが緩和されるといった特徴があるが、原因は全くわかっていない。そのため、わが国においては約700万人の患者が存在すると考えられるが、適切な診断と治療がなされていないのが現状である。われわれは、2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)の舌背塗布により、炎症や腫瘍などの器質的な変化が認められないにもかかわらず、舌に痛覚過敏が生じる舌痛症モデルマウスの作成に成功した。本研究では、同モデルに生じる舌熱痛覚過敏に対する Artemin の役割について検討した。舌背への TNBS 塗布により熱痛覚過敏が生じたマウスの舌背粘膜上皮において Artemin 発現量が増加し、抗 Artemin 中和抗体または Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) 特異的アンタゴニスト(SB366791)の舌粘膜投与により舌背に発症する熱痛覚過敏が抑制された。同時に、三叉神経節において Artemin 受容体である glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 3 陽性かつ TRPV1 陽性の舌投射三叉神経節ニューロン数が増加した。また、Artemin 舌粘膜持続投与により舌背に熱痛覚過敏が生じ、SB366791 舌粘膜投与により熱痛覚過敏が抑制された。さらに、TNBS 投与後、舌投射三叉神経節ニューロンの capsaicin に対する反応性が増大することをパッチクランプ法にて明らかにした。以上の結果から、TNBS 塗布により生じる舌背の熱痛覚過敏は、Artemin シグナルによる TRPV1 増加に起因した舌投射三叉神経節ニューロンの興奮性増大が関与していると考えられる。今後、舌痛症治療の標的分子として Artemin が期待される。

SS11-4

口腔内に痛みを引き起こす疾患と治療の実際

野間 昇

日大 歯 口腔診断

口腔内の痛みは、口腔内諸器官に由来することが多い。歯髄、歯周組織、口腔粘膜および舌などの軟組織によくみられる。歯科臨床において頻度が多いものとして、歯髄炎、歯周炎、智歯周囲炎、舌炎、アフタ、外傷、手術後疼痛などが挙げられる。これらの痛みは侵害受容性疼痛と呼ばれ、末梢組織に炎症や侵害刺激などが加わると侵害受容情報が中枢へ伝わり脳で痛みとして感じられる。これらの口腔内の痛みは急性痛であるために、早期の段階で治療を行うことで疼痛は消失する。

一方、口腔領域における慢性痛の代表的なものには、顎関節症、神経障害性疼痛や特発性口腔痛などが挙げられる。顎関節症は、咀嚼筋筋膜痛症候群を含み、咀嚼筋にトリガーポイントを伴うことがあり歯や顎骨など口腔内の痛みとして感じられる。治療としては行動学療法、咀嚼筋の運動療法が主体となる。神経障害性疼痛は口腔外科治療や根管治療によって生じる外傷性神経腫や血管圧迫により生じる三叉神経痛などがあり、歯科領域における発症頻度はまれではない。

特発性口腔痛で代表される舌痛症や burning mouth syndrome (BMS) は、舌や口腔内諸器官に炎症などの器質的な変化がみられないにも関わらず、患者は舌や口腔全体に焼けるような痛みを訴える。特発性口腔痛という概念もまた、一つの病態を指すものではなく、原因不明の口腔痛を指す症候群として使用されている。治療は、三環系抗うつ薬、抗痙攣薬などが広く使用されており、このなかでもシステマティックレビューによって有効性が示されている治療法としてはクロナゼパム、認知行動療法となっている。本講演では口腔内の痛みの原因となる侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、神経血管性疼痛、特発性口腔痛について症例を提示し疼痛発症機構の一端に触れてみたい。

SS11-5

口内炎による疼痛発症メカニズム  
人見 涼露  
九歯大 生理

口内炎による痛みは誰もが経験したことがあるだろう。口内炎による痛みが臨床上最も問題となるのは、口腔がんに対する化学・放射線療法の副作用として発症した場合である。この場合の口内炎は広範囲に発症し、誘発される痛みは激烈で食事も難しくなる。この痛みにより治療を断念する場合もあり、がん治療において大きな問題となっている。しかしながら、口内炎誘発疼痛メカニズムは不明であり、有効な疼痛緩和方法もない。口腔粘膜は体表皮膚とは組織学的、生理学的にも大きく異なるため、口内炎の疼痛メカニズムは既知のものとは大きく異なる可能性もある。しかしながら、動物口腔内への疼痛刺激は困難であり、現在では麻酔下での疼痛評価法しか知られていない。我々はこの状況を打開するため、覚醒下での口腔内疼痛評価法を開発し、口内炎による痛みの評価を試みた。

覚醒下ラットで口腔内の疼痛評価を行うために、新たに2種類の評価法（滴下法と人見法）を開発した。「滴下法」はカプサイシンなどの疼痛誘発物質の溶液を口腔内に滴下して、その後の疼痛関連グルーミング様行動を測定する。「人見法」はあらかじめラット下口唇に磁性ピアスを装着し、トレーニングにより長時間口腔粘膜を露出させることにより覚醒下で安定して刺激を行う方法である。50%酢酸の粘膜処理により口内炎を惹起させたラットに対して、これらの評価法を行った。口内炎惹起によりカプサイシン溶液およびクエン酸溶液滴下による疼痛関連行動が有意に増加し、機械的逃避閾値は低下した。さらに、健常粘膜と比較して口内炎粘膜では、錯角化層の剥離により著しく物質透過性が増加しており、著明な炎症性細胞の浸潤とともに脱顆粒したマスト細胞の割合が増加していた。また、カプサイシンおよび酸受容体である TRPV1 と ASIC3 の下唇粘膜支配神経における発現は口内炎惹起によって変化していなかった。

以上の結果から、口内炎による化学刺激、機械刺激による疼痛感受性亢進は、粘膜上皮の剥離による物質浸透性の増加と炎症ならびにマスト細胞の脱顆粒が関与している可能性が示唆された。今回開発した覚醒動物における口腔内疼痛評価法は、今後の口腔内疼痛研究に広く貢献できると考えている。

SS12-1

オーバービュー： 骨の司令塔—骨細胞—  
網塚 憲生、宮本 幸奈、本郷 裕美、  
佐々木宗輝、長谷川智香  
北大 院歯 硬組織発生生物

近年、骨細胞の役割が注目されるようになってきた。それは、周囲の骨基質ミネラルの維持・溶解（松尾・発表演題）、骨細胞ネットワークによるメカニカルストレス応答（小守・発表演題）、また、破骨細胞分化や骨改造に対する調節（中島・発表演題）などがクローズアップされてきたからである。

骨細胞は、骨芽細胞あるいは骨細胞自らが産生した骨基質中に埋め込まれた細胞であり、骨基質中の骨小腔に存在している。骨細胞は多数の細胞突起を伸ばすが、それら突起は骨細管を通して骨基質内に張り巡らされている。骨細胞の細胞突起は、骨細胞同士や骨表面に位置する骨芽細胞の突起と互いにギャップ結合で連絡することで、骨細胞ネットワーク（骨細胞・骨細管系）を形成している。このネットワークが力学的負荷を感受し、それを伝達するシステムとして機能すると考えられている。

骨細胞産生因子で注目を浴びているのが FGF23、sclerostin、RUNKL、DMP-1 であろう。FGF23 は近位尿管管の受容体（FGFR1c/klotho 複合体）に作用して NaPi IIa/IIc によるリン再吸収を抑制している。sclerostin は骨細胞から産生され、骨表面上の骨芽細胞機能を抑制することが報告されており、ミニモデリングにおける骨形成部位ではその産生が低下している。また、リモデリングを受ける部位において、骨細胞から産生される RANKL が破骨細胞を誘導する可能性が注目されており、今後の骨代謝研究のターニングポイントになり得る可能性を秘めている。骨基質ミネラルの維持・溶解については、1960 年代に提唱された骨細胞性骨溶解が再度、脚光を浴びており、現在、種々の X 線顕微鏡を用いた詳細な検討も特記すべきことと考えられる。

本シンポジウムでは、骨細胞におけるアップデートな研究を4名の先生方にご紹介戴く予定である。

SS12-2

骨細胞ネットワークによるメカニカル  
ストレス応答  
小守 壽文  
長大 院医歯薬 細胞生物

骨量は運動によって増加し、長期の臥床、神経損傷による不動、宇宙での微小重力状態環境下では減少し、いわゆる廃用性骨粗鬆症を呈する。このような力学的負荷あるいは非荷重をいかに感知し、骨量が制御されるかが長年議論されてきた。骨細胞は、骨の中で骨細管中を通る骨細胞突起によって連結し、神経細胞のネットワークのように、骨全体に骨細胞ネットワークを形成している。また、骨表面の骨芽細胞にも骨細胞突起で連結している。このため、古くから骨細胞ネットワークが、力学的負荷を感受し、それを伝達するシステムとして考えられてきた。しかし、骨細胞は骨の中に埋まっているために、その機能を解析することが困難であり、生体内の骨細胞の表現型を培養系で再構築させることも難しく、その機能は多くの間接的な観察から推測されてきた。まず最初に、骨細胞は骨リモデリングに重要と考えられてきた。それは、骨細胞が死ぬと、その部位がリモデリングによって置き換えられるからである。しかし、これは、骨細胞が本来骨吸収を抑制していることを示している訳ではない。骨細胞は、アポトーシスを起こしても貪食されないために、最終的に細胞膜は破綻しネクローシスを起こす。このネクローシスによって、骨吸収が亢進しリモデリングが起こるのである。骨細胞ネットワークは、2つのネットワークから成り立っている。ギャップ結合を介した細胞間ネットワークと、骨細管を介した細胞外ネットワークである。骨細管を介した細胞外ネットワークが破綻しない限り、骨細胞死が起こると細胞内の免疫惹起分子が骨細管を通過して骨表面に放出され、骨吸収が惹起される。したがって、骨細胞機能を見るためには、この2つのネットワークが破綻したマウスが必要である。これらが破綻したマウスをもとに、骨細胞機能を議論したい。

SS12-3

骨細胞性の骨溶解  
松尾 光一  
慶大 医 細胞組織

骨細胞は、骨芽細胞が自分の産生する骨基質に埋まりながら分化した細胞である。骨小腔の中に存在し、多数の樹状突起を骨細管の中に伸ばして骨基質内に「骨小腔-骨細管ネットワーク」を形成する。マウス長管骨では、授乳期のようにカルシウムの需要が高まっている時期に、骨小腔のサイズが大きくなることから、骨小腔周囲の骨基質を溶解して血中にカルシウムイオンを供給していると考えられる。すなわち骨細胞は、RANKLを発現し破骨細胞を活性化したり、sclerostinを発現して骨芽細胞を抑制したりするだけでなく、直接骨を溶解することで骨リモデリングに寄与している可能性がある。骨細胞が骨を内部から溶かすとしたら、そのメカニズムや制御を理解することは重要であるし、病的な骨溶解が見出されれば、将来的には骨細胞が治療標的になるかも知れない。

われわれは、骨小腔や骨細管を3次元的に可視化する方法を検討し、放射光施設(SPring-8、兵庫県)でX線位相差顕微鏡を、東北大学などとの共同研究で開発した(Biomed Opt Express, 2013)。これまで、授乳期・離乳期、あるいは副甲状腺ホルモン(PTH)投与後の野生型マウス、さらに骨硬化症や骨粗鬆症などの遺伝子改変マウスで骨小腔や骨細管の画像を取得し解析してきた。このX線位相差顕微鏡による解析手法は、高い解像度と定量性が得られる一方、現状では、視野が限定されること(解像度と視野はトレードオフの関係にある)、摘出骨を対象にせざるを得ないことなどの制約がある。それでも骨小腔や、骨細管の解析を行うためには有効な手法の一つであり、さまざまな応用へ向かうことが期待される。本発表では、最新の知見を紹介しながら、骨細胞性の骨溶解について議論する。



SS12-4

骨細胞による骨吸収制御機構

中島 友紀

東医歯大 院医歯 分子情報伝達

骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の絶妙なバランスにより、その恒常性が保たれており、常に新しく生まれ変わっている。これまで、古くなった骨を破骨細胞が壊すことで、骨リモデリングが始まり、骨は新しく作り変えられると考えられているが、その詳細はいまだ不明な点が多い。RANKLは破骨細胞分化を司る決定因子であることから、近年、治療標的として注目を集めている。しかし、生体レベルの骨組織において、どのような細胞が破骨細胞の分化を支持しているかはこれまで不明であった。最近、我々は骨組織におけるRANKL発現の局在を解析し、骨髄ストローマ細胞、骨芽細胞、またT細胞などの細胞集団に比べ、骨に埋め込まれた骨細胞が、強くRANKLを発現していることを見出した。骨細胞だけが特異的に蛍光を発する遺伝子改変マウスを作出し、骨細胞の新規単離培養系を構築し解析した結果、骨細胞のRANKL発現は、これまでRANKLの供給細胞と想定されていた骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞のそれをはるかに凌ぐ発現量があり、破骨細胞の分化支持能力も他の細胞に比べ優れていることが明らかになった。さらに骨細胞特異的なコンディショナルRANKL欠損マウスを作成し生体レベルで骨解析を実施した結果、破骨細胞の分化抑制による重篤な大理石骨病を呈することが見出された。興味深いことに、このマウスに観察される大理石骨病は、生後すぐには発症しておらず、成長に伴いその病状を発症し悪化していくことが見出された。このマウスでは骨細胞のRANKLだけが欠失されており、他の細胞のRANKL発現は維持されていることから、成体においては、骨細胞がRANKLを主に発現し、破骨細胞の分化を支持する中心的な役割を演じることで、骨リモデリングの開始を制御する司令細胞であると考えられる。

LS-1

骨修飾剤ビスフォスフォネートのポテンシャルとミステリー

米田 俊之

インディアナ大 医 血液腫瘍内科

骨粗鬆症治療薬のFirst lineとしての地位を確立しているビスフォスフォネート(BP)に関する最初の論文がScience誌に掲載されてから約45年が経過した。BPの有益性および安全性は、注射剤が主に高カルシウム血症、骨パジェット病、あるいはがん患者の骨転移に合併する骨関連事象(Skeletal-related Events, SRE)、そして経口剤は主に骨粗鬆症の治療に世界的に広く用いられていることにより証明されている。また今日の骨代謝研究の隆盛にBPが大きく貢献したことに異論の余地はない。近年、骨修飾剤(Bone-modifying agent, BMA)としてのBPの作用が注目されている。乳がん、前立腺がん、そして肺がんなど高率に骨に転移するがんは破骨細胞の骨吸収と密接な相互関連、いわゆる“Vicious Cycle”を保ちながら骨転移を成立、進展させる。したがって破骨細胞による骨吸収を選択的に抑制し、骨由来増殖因子の供給を制限することにより骨環境の肥沃性を低下させるBPはうってつけの薬剤として用いられている。また、着目すべきBMAの作用として、閉経前乳がん患者においてBPは抗がん作用を示し、生存期間を延長させることが報告されている。また骨粗鬆症の治療のためにBPを服用している場合、乳がんや直腸がんの発生率が有意に低下することや、長期の抗がん治療により誘発される骨粗鬆症(Cancer Treatment-induced Bone Loss, CTIBL)の予防に効果があることも示されている。しかしながら一方においてBPの長期使用は顎骨壊死(ONJ)、あるいは非定型的大腿骨幹部骨折の発生と関連するとの報告も見られる。BPに関連するONJの発生メカニズムは不明であるが、口腔にのみ発生する点が極めて特徴的であり、基礎歯学研究者が是非にも取り組まなければならないテーマである。今回の講演では、こういったBMAとしてのBPの有益作用と問題点についてオーバービューする。



LS-2

歯科基礎医学研究におけるメカノバイオロジーの可能性  
成瀬 恵治  
岡大 院医歯薬・システム生理

触覚、心拍など、私たちの体は常に機械的な刺激を受けている。細胞・組織への機械刺激は恒常性維持や細胞機能の活性化などに大いに役立っており、当分野の研究は「Mechanobiology」として発展を遂げてきた。昨今、細胞を取り巻く力学的な環境の違いが幹細胞の分化制御にかかわることや、血管前駆細胞にシェアストレスを加えると内皮細胞に、ストレッチの刺激を加えると平滑筋細胞に分化することなどが報告されている。このように細胞培養・組織再生の過程で力学的環境の制御や機械刺激は細胞の分化・増殖をコントロールするための欠かせない手法となりつつある。今回は、メカノバイオロジーの歯科基礎医学への応用、新たな可能性についてご紹介したい。

LS-3

ウーロン茶ポリフェノールの齶蝕抑制効果とそのメカニズム  
仲野 道代  
岡大 院医歯薬 小児歯

お茶のう蝕抑制効果は古くから知られており、その効果はフッ素によるものと考えられてきたが、最近ではお茶に含まれるポリフェノールが、その効果をもたらすことが明らかになっている。特に、ウーロン茶に含まれるポリフェノールが顕著なう蝕抑制効果を発揮していることを、私達のグループで明らかにした。今回は、この抑制効果のメカニズムについて分子生物学的手法によるう蝕抑制効果の検証について紹介したいと考えている。

ウーロン茶はお茶の新芽を摘み取り、発酵の途上に加熱して製造された半発酵茶で、緑茶は不発酵茶、紅茶が発酵茶に属する。緑茶のポリフェノールがほとんどカテキン類であるのに対して、ウーロン茶や紅茶には製造過程の発酵作用によってできたカテキン類の重合体が含まれ、このカテキン重合体が強いう蝕抑制作用を示すウーロン茶ポリフェノール(Oolong tea polyphenols; OTPP)である。OTPPは、う蝕の主要な病原細菌であるミュータンスレンサ球菌の産生するグルカン合成酵素(Glucosyltransferase: GTF)の活性抑制効果を示す。この効果は、緑茶や紅茶の抽出物と比較してもOTPPが最も強い。この抑制メカニズムの活性阻害様式を調べてみると、非拮抗阻害様式であることが明らかとなった。GTFは遺伝子配列から、スクロースが結合しグルコースとフルクトースに分解されるN末端側2/3の領域とグルコースが転移し、グルカンが合成されるC末端側1/3の繰り返し構造からなるグルカン結合領域が存在する。それぞれの領域の断片タンパクを作製し、グルカン合成に及ぼすOTPPの作用を調べると、グルカン結合領域へのグルコースの結合阻害が濃度依存的に認められた。また、OTPPのGTF活性阻害が非拮抗阻害であることから、OTPPはグルカン結合領域へのグルコースの結合を阻害することによることが明らかとなった。今後はこれらの知見をヒトでの応用につなげていけると考えている。

LS-4

エルゼビア社主催 若手研究者のための Author Workshop : 学術論文作成の基本と EES を用いた Journal of Oral Biosciences 誌への投稿方法について  
大島 勇人  
新大院医歯 硬組織形態、J. Oral Biosci.誌編集長

研究はその成果としての論文や本の出版を伴う。言い換えれば、研究者は論文や本の出版を通して社会に研究成果を還元する義務を負っているのである。したがって、論文執筆作業は研究者にとって極めて重要な社会的な活動であるといえる。しかしながら、研究開始から論文出版までの道のりは長く険しく、論文執筆作業は研究者にとってはハードルの高いタスクである。論文を出版するためには、論文を雑誌に投稿し審査を受け、受理されなければならない。論文審査はピア・レビューなので、研究者は論文を審査される側と審査する側の双方の経験を経ることになるが、論文審査では読みやすい（理解しやすく、論文の主題が伝わる）論文と、冗長で難解な（論文の主題が読み取れない）論文に遭遇する。これは論文の構成・骨組み（organization、structure）に起因する問題である。論文の優劣を決めるのは、適切な研究目的の設定と効果的な研究方略の立案、そして実験結果であるが、論文の構成が論文の価値を大きく左右する。論文執筆にあたり、各セクション（Introduction、Materials & Methods、Results、Discussion）間で内容の重複を避け、各セクション相互を有機的に関連づけることが、科学的な重要性をつかみ易い論文を作成するコツである。また、研究目的には理論的根拠（rationale）が重要で、未解決の問題点の明示とその問題を解決する研究方略の立案が鍵を握る。良い論文を書くためには、論文を強く意識して研究を進めることが必要になる。

本講演では、若手研究者を対象に学術論文作成の基本を概説すると共に、科学的な重要性をつかみ易い論文を効率的に作成するコツを伝えたい。さらに、エルゼビア社の論文投稿システム（EES）を使って Journal of Oral Biosciences へ論文を投稿する方法についても説明する。