

はしがき

平成24年度文部科学省の私立大学戦略的研究基盤形成支援事業に本学が申請した研究プロジェクト「老化の抑制と疾患の制御における環境ストレスとゲノムの応答」が採択されました。実施期間は平成24年から28年度までの5年間で、その間各年度4,000万円の研究費が配当される予定です。また初年度に研究設備として、次世代型HPLC(798万円)、キーエンス製蛍光顕微鏡(1312.5万円)、イメージアナライザー(869.4万円)の購入が認められました。

さらに本プロジェクトを推進するため共用研究施設として、歯学部本館6階に「老化制御研究センター」が新たに設置されました。実験室の総面積は95平方メートルで、この施設は既に設置済みの「先端科学研究センター」(257平方メートル)に隣接し自由に行き来することができるようになっています。センター長として早川浩(教授)、センター所属の教員として石井健士(助教)が任命され、センターの運営にあたっています。配当された予算は、本プロジェクト研究を行う本学所属の14名の研究者に配分して研究を推進しています。

本中間報告書はプロジェクト前期における研究成果をまとめたもので、この成果の上にとり、後期に向けての研究展開の基盤としたいと考えています。この中間報告書が内外の研究者間の連携を深め、新たな学術交流や共同研究の機会になれば幸いです。

最後に本プロジェクトを常に支援して頂いている福岡学園の田中健藏理事長、福岡歯科大学の北村憲司学長はじめ多くの方々に感謝します。また本研究の企画にあたり、本学の先端科学研究センター長である関口睦夫教授にお世話になりました。関口教授にはプロジェクトの参加者として名を連ねていただいておりますが、「先端科学研究センター」の実務がありますので本研究からの研究費は配分せず支援いただいております。

平成26年9月

代表者 早川 浩

平成24年度選定「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」 研究進捗状況報告書

学校法人名 福岡学園 大学名 福岡歯科大学

研究組織名 老化制御研究センター

プロジェクト所在地 福岡市早良区田村2-15-1

研究プロジェクト名 老化の抑制と疾患の制御における環境ストレスとゲノムの応答

研究観点 研究拠点を形成する研究

研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
早川 浩	歯学部	教授

プロジェクト参加研究者数 19 名

該当審査区分 理工・情報 生物・医歯 人文・社会

研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
[学内]			
早川 浩	生化学・教授	RNAの酸化と老化	老化抑制の機構の解明
関口 睦夫	先端科学研究センター・教授	酸素ストレスと核酸の酸化	ゲノム安定性と老化の制御
日高 真純	分子機能制御学・教授	発がんを抑制するアポトーシスの機構	細胞死と細胞老化の制御
谷口 邦久	病態構造学・教授	がん細胞の増殖抑制	口腔がんの転移抑制
梅津 桂子	生化学・教授	酸素ストレスによるゲノム再編	老化過程におけるゲノム再編
池邊 哲郎	口腔外科学・教授	粘膜・皮膚の老化と炎症ストレス	ゲノム酸化と老化の抑制
佐藤 博信	咬合修復学・教授	顎骨の老化とコラーゲン	老化の個体差のメカニズム解明
岡部 幸司	細胞生理学・教授	骨代謝異常とシグナル伝達	骨代謝性疾患の病態生理
沢 禎彦	機能構造学・教授	腫瘍の転移と内皮細胞の応答	疾患に対する生体のゲノム応答
大星 博明	内科学・教授	脳血管障害と免疫・酸素ストレス	脳血管障害の病態と老化
川野 庸一	眼科学・教授	眼炎症性疾患の病態解析	免疫異常の抑制

坂上 竜資	口腔治療学・教授	口腔上皮細胞の分化とゲノムのエピジェネティックな変化	ゲノム安定性と老化の制御
廣藤 卓雄	総合歯科学・教授	プロバイオティクスと口腔疾患	高齢者の口腔疾患の制御
米田 雅裕	総合歯科学・教授	加齢に伴う口腔環境の変化	老化における生体防御
(共同研究機関等)			
Bruce Demple	ニューヨーク州立大学 (アメリカ)・教授	活性酸素によるDNA障害の防御	発がん抑制の機構
Robert P.P. Fuchs	マルセイユ大学 (フランス)・教授	DNA損傷の認識と処理機構	DNA損傷と発がん
蔡 劍平	北京医院 (中国)・教授	活性酸素による老化とその抑制	老化抑制の機構
Samuel H. Wilson	N I H (アメリカ)・部長	DNAポリマーゼの異常と変異	環境変異原と老化
Errol C. Friedberg	テキサス大学(アメリカ)・教授	修復欠損遺伝病の解明	DNA修復と発がん・老化の抑制

研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

加齢に伴い発症するがんや疾患の原因には遺伝子の変異や発現異常が背景にあり、それに加えて生活習慣や免疫力の低下による脳梗塞や骨折、感染などがそれらを悪化させる。本研究の目的はゲノムを安定に維持する分子機構を明らかにすることで老化に伴う発がん抑制の手がかりを得るとともに遺伝子発現を正確に実行する分子機構を明らかにし、老化抑制への手がかりを得ようとするものである。さらに疾患の悪性化、即ちがんの転移や脳梗塞の重篤化、骨破壊性疾患を悪化させるメカニズムを明らかにすることで、これらの疾病の「減病化」の方策を見だし、知的にも肉体的にも健康な高齢者を増やす基盤をつくることを目的とする。

「老化」は不可避なものであるとしても、その分子機構を明らかにし、老化を制御することは可能と考えられる。老化のメカニズムについては様々な仮説が提唱されているが、その中でも酸化ストレス説はそれらの仮説を包括するものとして広く認められている。正常な代謝活動で生体内で生じる活性酸素は様々な生体高分子を酸化する。その中でも老化やがんの発生に直接関連すると考えられている核酸の酸化に注目し、酸化ストレス下の遺伝情報の維持とその遺伝子発現の正確さを保証する仕組みの全貌を明らかにする。

「がん」は依然として日本人の死亡率の最上位を占め、その克服は言うまでもなく重要な課題である。加齢が発がん因子の1つである限り、高齢者の発がん率上昇は不可避であるにせよ、迅速で正確な診断、および転移の阻止は疾病制御上不可欠であり、本プロジェクトの一群の研究者は基礎と臨床の連携のもとにこれに取り組んでいる。

「脳梗塞」や「骨折」なども高齢者において重要な課題である。脳梗塞は発生直後にし

かるべき治療がなされれば大幅に症状は軽減されるとされるが、時間的な制約が大きく現実問題としては難しい。しかしながら発生後ある程度時間が経過しても症状を軽減出来る手法が確立できれば大きな進歩となる。本プロジェクトでは脳梗塞悪化のメカニズムを明らかにし、それを軽減する治療法の確立を目指している。高齢者における骨折の予後は患者の QOL に決定的な影響を持つので、骨破壊に中心的役割を果す破骨細胞のイオン輸送や、骨吸収、石灰化の分子メカニズムを明らかにし、分子標的による治療法の確立を目指している。

上記の目的の為、医科歯科総合病院を併設し、かつ分子生命科学から基礎歯科・医学、臨床歯科・医学研究に従事する本学園の総勢 14 名の研究者を結集し「分子」から「ベッドサイド」までの射程を持つ研究プロジェクトを推進する。それに加え、海外でこの分野におけるトップクラスの研究者、米国・NY 州立大の B. Demple 教授、フランス・マルセイユ大の R. Fuchs 教授、中国・北京医院の蔡教授、米国 NIH の S. Wilson 部長、米国・テキサス大の E. Friedberg 教授などの参加のもと本プロジェクトを進める。これらの海外研究者とはこれまで参加メンバーが共同研究を行っている。このような研究に本学の大学院生が加わることで若手の育成にも大きな効果が期待出来る。こうした活動をもとに本学に先端的な研究拠点を形成出来ると考えている。

研究組織

プロジェクトを達成する為には本学の 14 名の研究者がチームを組んで計画的に研究を進めている。それぞれの研究者の専攻分野と職、研究課題は前項に示すとおりである。本研究は大きく 2 つの問題に向かって研究を進めている。

(A) 発がんや老化の抑制機構の解明

(B) 疾病の制御

(A) の研究には基礎生命科学および基礎歯科・医学の研究者が、(B) の研究は臨床歯科・医学研究に従事する研究者が独自の専門性を生かしながら、必要に応じて緩やかな連携を保ちつつ研究活動を進めている。各研究担当者には大学院生を含め多くの研究者が共同研究者として参加し、このプロジェクトを支え研究を進展させている。それはのちに示す発表論文の多くに大学院生がファーストオーサーとして名前を連ねていることから判る。

その他、このプロジェクトにはそれぞれの分野において先導的な研究を進めている米国、フランス、中国の研究者と連携し共同研究を進めている。その成果は既に論文の形で明記するとともに、シンポジウム “Oxidative Stress and Aging”でも公開された。

本研究の代表者である早川浩は今回大学内に新たに設置された老化制御研究センターのセンター長として、メンバーおよびその共同研究者が自由に使用できるよう、その管理・運営に当たっている。センター主催のシンポジウム（第一回老化制御シンポジウム “Oxidative Stress and Aging”2013 年 9 月 9 日）や、2 回の研究発表会（2013 年 6 月 26 日、

2014年7月30日)を主催した。これらのシンポジウムにおいては、学内外のみならず米国・中国からこの分野で先端的な研究を進めている研究者を招き、国際的な情報交換の場とした。その他これまでに、米国人1名を含む9人の研究者を招き、最新の研究成果について合計6回の研究セミナーを主催し情報交換をおこなった。

研究施設・設備等

本プロジェクトを推進するための共用研究施設として、歯学部本館6階に「老化制御研究センター」が新たに設置された。実験室の総面積は95平方メートルで全体の拡散防止の封じ込めレベルはP2である。この施設は既に設置済みの「先端科学研究センター(257平方メートル)」に隣接し自由に行き来することが出来るようになっている。そのため既に先端科学研究センターに設置済みの施設(細胞培養室、低温実験室、ウイルス実験室)ならびに装置(タンパク質精製分析装置、DNA解析システム、超遠心機、P2レベル安全キャビネット、CO₂インキュベーター、共焦点レーザー顕微鏡、リアルタイムPCR、フローサイトメトリーシステム等)は相互に自由に使用できる体制になっている。本研究費で新たに設置した装置は次世代型HPLC(798万円)、キーエンス製蛍光顕微鏡(1312.5万円)、イメージアナライザー(869.4万円)などで、効率よく充実させることが出来た。これらの機器は頻繁に利用され、特にイメージアナライザーやキーエンス製蛍光顕微鏡などはほぼ毎日使用されている。

研究発表会

「老化の抑制と疾患の制御における環境ストレスとゲノムの応答」

日時：平成 26 年 7 月 30 日（水）9 時 30 分～17 時 30 分

場所：福岡歯科大学本館 5 階 504 教室

学長挨拶

北村 憲司

セッション I (9:30~12:00)

司会：関口 睦夫

酸化RNAの排除機構

早川 浩

酸化ヌクレオチドと遺伝情報発現異常

井口 八郎

「高齢者口腔粘膜の細胞分子生物学的基盤についての研究 ~酸化ストレスによる
ケラチノサイトの細胞老化と発がんとの関係~」

池邊 哲郎

クロマチンリモデリング因子 Rdh54 による染色体安定化機構

~セントロメア特異的ヒストン Cse4 を介した新規作用について~

梅津 桂子

発がんを抑制するアポトーシスの機構

日高 真純

休憩

セッション II (13:00~15:00)

司会：早川 浩

TRP 分子による硬組織石灰化と疾患発症機構の解明

岡部 幸司

歯周病原菌由来 TLR リガンドによる糖尿病性腎症の発症

沢 禎彦

S-PRG イオン溶出液が口腔環境におよぼす影響

米田 雅裕

実験的自己免疫性ぶどう膜炎における IL-27 と IL-35 の役割

川野 庸一

休憩

セッション III (15:10 ~17:10)

司会：日高 真純

プロバイオティクスと口腔疾患

廣藤 卓雄

細胞培養技術を用いた歯と歯周組織の再生に関する研究

坂上 竜資

顎骨のコラーゲンの特異性に関する研究

佐藤 博信

脳血管障害と免疫・酸化ストレス

大星 博明

研究発表会要旨

課題名 **酸化 RNA の排除機構**

研究代表者 早川 浩

所属 機能生物化学講座・生化学分野

発表要旨

これまでの研究で酸化 RNA に特異的に結合するタンパク質、Auf1/HNRNPD を同定したが、今回その生化学的性質について以下のことを明らかにした。

(1) 化学合成された酸化型グアニン(8oxoG)を含むリボ型オリゴマーをアガロースビーズに共有結合させた新規プローブを開発した。

(2) 上記のプローブを用い、細胞抽出液中の Auf1/HNRNPD タンパク質は 8oxoG を特異的に認識し、結合することを明らかにした。

(3) 精製された組み換え Auf1/HNRNPD タンパク質はそれ単独では酸化 RNA を特異的に認識しないが、Auf1 ノックアウト細胞の細胞抽出液と精製組み換えタンパク質を混和すると酸化 RNA 特異的結合能が回復する。

以上のことから、Auf1/HNRNPD タンパク質は他のタンパク質と複合体等を形成し、8oxoG を含む酸化 RNA に特異的に結合することで酸化損傷 RNA を転写・翻訳系から排除していると考え、この仮説のもと現在研究を進めている。

課題名 **酸化ヌクレオチドと遺伝情報発現異常**

研究代表者 井口 八郎

所属 先端科学研究センター客員教授

発表要旨

大腸菌の *mutT* 遺伝子の欠損株では酸化ヌクレオチドの 8-オキシグアニン (8-oxoG) によって「アンバー突然変異の読み過ごし」が起こることが知られている。この現象は *in vivo* での 8-oxoG の遺伝情報発現の異常という視点から注目される。本研究では、8-oxoG に起因するアンバー突然変異の読み過ごしが高頻度にかかる大腸菌のミュータントを多数分離し解析した。その結果、分離したミュータントは、ヌクレオチド生合成に係わる遺伝子、RNA や DNA ポリメラーゼの遺伝子、膜タンパク質の遺伝子、タンパク質生合成に働く解離因子の遺伝子などのミュータントであることがわかった。これらの遺伝子は、例えば 8-oxoG を取り込まないように、あるいは作用しないように働いているが、ミュータントはそうした制御を許容するようになったものであると推測している。網羅的に一連のミュータントを解析することによって、酸素ストレスに対抗して働く遺伝子の発現調節機構を明らかにする試みについて報告する。

課題名 「高齢者口腔粘膜の細胞分子生物学的基盤についての研究

～酸化ストレスによるケラチノサイトの細胞老化と発がんとの関係～

研究代表者 池邊 哲郎

所属 口腔外科学分野

発表要旨

正常細胞は ROS に対する様々な防御反応を有する。その防御反応の 1 つが細胞老化であると考えられる。細胞老化の最も重要な特徴は不可逆的な細胞周期の停止である。正常細胞は細胞老化することによってがん化を防いでいると言える。そこで、正常ケラチノサイトと口腔扁平上皮癌細胞とを培養し、ROS（過酸化水素）で処理して、細胞老化機構の違いを比較した。その結果、正常ケラチノサイトでは ROS により細胞老化マーカーである P16^{INK4a} の発現が亢進したが、口腔扁平上皮癌細胞では P16^{INK4a} には変化がなかった。P16^{INK4a} の発現を調節するエピジェネティック状態を調べると、正常ケラチノサイトでは ROS によって P16^{INK4a} のプロモーター領域のメチル化レベルが低下していた。メチル化抑制によって P16^{INK4a} の発現が増加することが考えられた。正常ケラチノサイトと口腔扁平上皮癌細胞の違いは P16^{INK4a} の発現にあることが示唆された。がん細胞は細胞老化を回避しているであろう。

課題名 クロマチンリモデリング因子 Rdh54 による染色体安定化機構

～セントロメア特異的ヒストン Cse4 を介した新規作用について～

研究代表者 梅津 桂子

所属 機能生物化学講座・生化学分野・教授

発表要旨

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には、Swi2/Snf2 サブファミリーに属する相同性の高いクロマチンリモデリング因子 Rdh54 と Rad54 が存在し、共に相同組換えに機能している。我々は酵母二倍体細胞を用いたゲノム安定性の解析から、*rdh54* 欠損株においては、組換え因子 Rad52 の欠損に依存して染色体喪失が上昇することを見出した。さらにこの株では、セントロメア配列に依存してプラスミド喪失が上昇し、Rdh54 はセントロメア領域を介して染色体の安定化に寄与することが示唆された。一方、Rad54 はヒストン H3 と相互作用することが知られていることから、Rdh54 はセントロメア特異的なヒストン H3 バリエントである Cse4 と相互作用するとの仮説を立て、細胞内局在の観察と免疫沈降法により検証した。蛍光タンパク質と融合させて局在を観察すると、Rdh54 と Cse4 はセントロメアクラスターと考えられるドットに共局在した。大腸菌発現系より精製したタグ付きのポリペプチドを用いた免疫沈降により、Rdh54 は Cse4 と直接相互作用することが分かった。Rad54 も Cse4 と相互作用するが、Cse4 を断片化して解析すると Rdh54 のみと特異的に

結合する領域が得られ、最終的には Cse4 中央部の約 30 アミノ酸残基に特定された。アミノ酸置換により、結合には領域内の複数の Lys 残基の正の荷電が関与していることが示唆された。一方、Rdh54 の Cse4 結合領域は中央部の約 300 アミノ酸残基となり、ヒストン H3 との結合領域とは異なることが分かった。以上の結果をもとに、酵母細胞内での Rdh54 と Cse4 間の相互作用と染色体安定化機構との関わりについて解析を進める予定である。

課題名 **発がんを抑制するアポトーシスの機構**

研究代表者 日高真純

所属 細胞分子生物学講座・分子機能制御学分野

発表要旨

DNA 上に生じた修飾塩基 O⁶-メチルグアニンは DNA 複製過程で塩基の誤対合を形成し、突然変異さらには発がんをひき起こす原因となる。しかし、高等生物はこの損傷を持つ細胞にアポトーシスを誘導し個体から排除することで変異細胞の出現を抑制している。我々はジーントラップ法を用いて、このアポトーシス誘導に関わる新規因子として MAP01 と HmgA2 を同定した。MAP01 は細胞質に局在し、発がん抑制因子の一つである FLCN と細胞内のエネルギー感知キナーゼである AMPK と相互作用する。siRNA を用いた Ampk α あるいは Flcn 遺伝子ノックダウン細胞では、アルキル化剤処理後のサブ G₁ 細胞の出現が顕著に抑制されたことから、AMPK と FLCN も MAP01 同様にアポトーシス誘導のシグナル伝達経路において必要であることが示された。それに対して、HmgA2 は細胞核内でクロマチンに結合し、ヘテロクロマチン化を介して細胞老化においても機能することが報告されている。HmgA2 遺伝子の発現抑制により細胞死誘導が顕著に抑制されたことから、HmgA2 は核内においてアポトーシス誘導の初期過程で機能することが示唆された。

課題名 **TRP 分子による硬組織石灰化と疾患発症機構の解明**

研究代表者 岡部幸司

所属 細胞分子生物学講座 細胞生理学分野

発表要旨

歯は上皮-間葉系の相互作用により主に象牙芽細胞 (Ob) とエナメル芽細胞 (Ab) から形成され、Ab 消失後は主に Ob により石灰化が維持調節されるが、それぞれの石灰化過程を担う分子の同定や石灰化異常を示す疾患との関係は不明である。我々は歯牙石灰化を調節する新規分子として、生体中でも特に Ob や Ab に極めて高発現する TRP 分子として発見したキナーゼ活性を有するユニークな Ca²⁺透過型陽イオンチャネルである TRPM7 に注目し、この分子によるミネラル輸送、及び、キナーゼ活性とこれに続く歯の石灰化調節機構への関与

を検討した。マウス組織解析により全身の中でも、TRPM7 は歯牙の Ob と Ab に特に強く発現し、TRPM7 キナーゼ変異マウスでは Fe の沈着減少や歯牙の石灰化障害が認められた。また、Ob と Ab の細胞株においても TRPM7 の強い発現と共に TRPM7 様の陽イオン輸送が優位に確認され、TRPM7 のノックダウンは細胞外基質の石灰化を抑制した。以上より、TRPM7 が歯牙の石灰化維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

課題名 **歯周病原菌由来 TLR リガンドによる糖尿病性腎症の発症**

研究代表者 沢 禎彦

所属 生体構造学講座

発表要旨

糖尿病の血中に見られる終末糖化産物は単球や腎組織細胞に自然免疫受容体 toll-like receptor (TLR) の発現を誘導する。今回、糖尿病マウス腎糸球体における TLR の発現と TLR リガンドによる腎症の発症を検討した。ストレプトゾトシン誘導性 I 型糖尿病マウスおよび高脂肪飼料誘導性 II 型糖尿病マウス、*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS 投与 I 型糖尿病マウスを用いた。糖尿病マウス腎糸球体では一般組織血管と異なり TLR2/4 の発現が見られた。LPS 投与糖尿病マウスは対照マウス全数生存期間に全数死亡し、その尿タンパク・尿糖は高値で、腎糸球体では IL-6, TNF- α , TGF- β および 1 型コラーゲンの増生が観察された。糸球体の終末糖化産物蓄積と TLR 発現誘発、血中 LPS の TLR を介する糸球体内皮活性化、さらにメサンギウムの内皮由来サイトカインによる活性化が糸球体硬化を促進させると考えられた。

課題名 **S-PRG イオン溶出液が口腔環境におよぼす影響**

研究代表者 米田雅裕

所属 総合歯科学講座総合歯科学分野

発表要旨

界面機能性ガラス surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) はフッ素、ホウ素、ストロンチウム等のイオンを溶出しデンタルプラークに強い歯科材料として注目されている。本研究では、S-PRG 溶出液が口腔環境に及ぼす影響について検討した。S-PRG 溶出液は *Porphyromonas. gingivalis* のプロテアーゼ活性、ゼラチナーゼ活性を抑制し、*P. gingivalis* と *Fusobacterium nucleatum* との共凝集も抑制した。われわれはまた S-PRG 溶出液がバイオフィームにおよぼす影響についても検討した。S-PRG 溶出液はグラム陽性菌および唾液中細菌によるバイオフィーム形成を阻害することが明らかになった。さらに S-PRG 溶出液には形成されたバイオフィームを破壊する能力も認められた。S-PRG の溶出液だけでなく S-PRG 含有歯面研磨剤にも同様の作用があることがわかった。

課題名 **実験的自己免疫性ぶどう膜炎における IL-27 と IL-35 の役割**

研究代表者 川野庸一

所属 総合医学・眼科学

発表要旨

【目的】 IL-27、IL-35はともにIL-12関連サイトカインであり、免疫抑制作用を持つ可能性が示されている。実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)の炎症各期でのエフェクター細胞に対するIL-27とIL-35の作用を明らかにすることを目的とした。【対象と方法】 C57BL/6マウスに網膜抗原 (IRBP)を用いてEAUを誘導した。0, 7, 14, 21日目に所属リンパ節および脾臓を摘出し磁気ヒースシステムを用いてCD4 陽性T細胞を精製し、抗CD3抗体およびIRBP 刺激下で培養した。リコンヒナントIL-27(rIL-27)またはIL-35(rIL-35)を添加し、IFN- γ 、IL-17産生を3日後にELISAで、7日後にFACSを用いて検討した。また転写因子の発現をPCRにて検討した。【結果】 rIL-27はd0, d7でのみIFN γ 発現を増加させ、EAU各期のIL-17産生を抑制した。rIL-35はIL-17産生に影響を及ぼさなかったか、炎症後期にIFN- γ の発現を増加させた。またEAU各期においてrIL-27はTh1特異的転写因子(T-bet) の発現を増加させ、Th17特異的転写因子(ROR γ t)の発現を抑制したか、rIL-35はT-bet, ROR γ t の発現に影響を及ぼさなかった。【結論】 IL-27は炎症各期のTh17を直接制御する一方、IL-35は炎症後期にCD4陽性T細胞からIFN- γ を発現させ、Th1を介する炎症抑制機構に関与する可能性が示唆された。

課題名 **プロバイオティクスと口腔疾患**

研究代表者 廣藤卓雄

所属 総合歯科学講座・総合歯科学分野

発表要旨

乳酸菌には、免疫賦活化作用、コレステロール低減作用、抗菌作用など、生体防御機能を発揮する菌株が多く、近年これらを口腔内環境の健全化に利用しようという動きが出ている。われわれは乳酸菌 *Lactobacillus salivarius* WB21 (Ls WB21) 株に着目し、本菌が口腔内環境に与える影響について検討してきた。本研究では Ls WB21 配合タブレットの口臭抑制効果を明らかにするために、口臭患者を対象に二重盲検ランダム化クロスオーバー試験を実施し、Ls WB21 配合タブレットに口臭と歯周組織の改善効果があることを明らかにした。また、タブレットで誤嚥の危険性がある障害者や高齢者への応用を想定し、Ls WB21 配合オイルを開発し、その効果を歯周病患者を対象としたプラセボ対照二重盲検比較試験により検討した。乳酸菌は酸を産生し、う蝕病巣より分離されることから、う蝕への関連性が示唆されている。そこで2種類の乳酸菌配合タブレット摂取直後のう蝕リスク因子の変化を調べた。乳酸菌でない様々な口臭抑制剤についても、口臭や口腔内環境に与える影響を

調べる必要がある。本研究では、ヒノキチオール配合口腔ケア用ジェル、塩化セチルピリジニウム・グリチルリチン酸二カリウム・キキョウエキスの3種の有効成分を配合したトローチ、亜鉛イオン溶液について、口臭や口腔内環境、口腔内細菌叢に与える影響を調べた。

課題名 **細胞培養技術を用いた歯と歯周組織の再生に関する研究**

研究代表者 坂上竜資

所属 口腔治療学 歯周病学

発表要旨

上皮間葉転換を生じる細胞群としては、発生過程における外胚葉から神経堤を経て間葉への転換と、がん化の過程における上皮細胞の未分化細胞への変化が挙げられる。もしも正常な状態で恒常的に上皮間葉転換を起こす成体細胞を得ることができれば、このメカニズム解明に役立つとともに、再生医療における幹細胞の細胞ソースとして有効利用できる可能性がある。

われわれは、げっ歯類の切歯歯胚の一部であるサービカルループの細胞に着目し、同部に特異的な幹細胞マーカーである Sox2 に対する免疫染色などを行なって解析をしてきた。近年これが、エナメル質のみならず、エナメル質に接する接合上皮にもセメント芽細胞にも分化するというエビデンスが蓄積しつつある。本研究は、この細胞を再生医療の細胞ソース候補として再定義し、その可能性を *in vitro* と *in vivo* の研究によって多角的に確かめることを目的としている。途中経過と将来展望とを発表する。

課題名 **顎骨のコラーゲンの特異性に関する研究**

研究代表者 佐藤 博信

所属 口腔治療学 冠橋義歯学

発表要旨

咀嚼機能による特有な力学的環境にある顎骨は、リモデリングのスピードが速いなどの特有の代謝を営んでいる。その代謝の最終産物であるコラーゲンは骨に柔軟性を与え、コラーゲンの翻訳後修飾であるリジンの水酸化の程度は骨の質的性状を左右する。ヒト献体の下顎骨、上腕骨および大腿骨のコラーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥骨) とリジンの水酸化の程度 (水酸化リジン量 : mol/mol コラーゲン) を定量分析したところ、下顎骨は特有のコラーゲン性状を有することがわかった。下顎骨のコラーゲン量は多く、反対に水酸化リジン量は少なかった。コラーゲン量と水酸化リジン量には大きな個人差があったが、下顎骨の水酸化リジン量では個人差が小さかった。コラーゲン量の多い下顎骨は咀嚼に対する柔軟性を有

している可能性があり、下顎骨特有の力学的環境が粗面小胞体での翻訳後修飾因子やコラーゲンシヤペロンに影響し、リジンの水酸化を低下させ、コラーゲン線維形成に影響している可能性が推測される。

課題名 **脳血管障害と免疫・酸化ストレス**

研究代表者 大星 博明

所属 総合医学講座 内科学分野

発表要旨

脳血管障害は、我が国の主要死因であるのみならず、寝たきりや要介護となる第1位の原因であり、国民病としての重要性が増している。しかしながら、その後遺症を軽減する画期的な治療法は未だ開発されていない。近年急性期脳梗塞における分子機構・シグナル伝達が徐々に明らかになり、脳虚血発症後に脳血流以外の因子が脳梗塞を拡大・増悪させることが示唆されているが、我々は最近、脳梗塞増悪過程におけるインターロイキン(IL) 23-17 axis の重要性を明らかにした。本研究は、遺伝子改変動物等を用い、脳梗塞における免疫応答や血液脳関門破綻等の炎症反応の機構を解明し、新規治療法の標的としての意義を探究することを目的としている。

本研究では、脳虚血早期における自然免疫機構の解明を試み、昨年までに Toll 様受容体 TLR2 と TLR4 およびその下流シグナル MyD88 が IL23 の産生に寄与することを明らかにした。また、傷害脳組織から放出されて TLR2/4 を刺激する物質が、従来抗酸化物質と認識されてきた peroxiredoxin family であり、新規の damage-associated molecular patterns (DAMPs) として、脳虚血後の炎症惹起物質として働くことを明らかとした。今年度はさらに脳梗塞の innate immunity におけるミクログリア・マクロファージの役割および pericyte の血液脳関門での役割について検討を行った。

外部評価

平成 26 年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 「老化の抑制と疾患の制御における環境ストレスとゲノムの応答」 前半 2 年間の研究状況に対する外部評価

平成 26 年 7 月 30 日、福岡歯科大学 504 号室において本研究の研究発表会が開催され、次いで以下の構成員による中間評価に関わる外部評価委員会が開かれた。その報告を以下に示す。

評価委員会の構成（五十音順）

米国カンザス大学准教授	岩熊智雄	(腫瘍学、生化学)
仏国ナント大学名誉教授	高橋正行	(生物物理学、分子生物学)
九州大学名誉教授	林 健志 (委員長)	(ゲノム科学、分子生物学)

記

研究発表会において各研究課題担当者から質疑を含め約 30 分の研究成果の詳細を聴取した。発表者とその題目は次の通りである。

1. 早川 浩 酸化 RNA の排除機構
2. 井口八郎 酸化ヌクレオチドと遺伝情報発現異常
3. 池邊哲郎 高齢者口腔粘膜の細胞分子生物学的基盤についての研究
— 酸化ストレスによるケラチノサイトの細胞老化と発がんとの関係
4. 梅津佳子 クロマチンリモデリング因子 Rdh54 による染色体安定化機構
— セントロメア特異的ヒストン Cse4 を介した新規作用について
5. 日高真純 発がんを抑制するアポトーシスの機構
6. 岡部幸司 TRP 分子による硬組織石灰化と疾患発症機構の解明
7. 沢 禎彦 歯周病病原菌由来 TLR リガンドによる糖尿病性腎症の発症
8. 米田雅裕 S-PRG イオン溶出液が口腔環境に及ぼす影響
9. 川野庸一 実験的自己免疫性ぶどう膜炎における IL-27 と IL-35 の役割
10. 廣藤卓雄 プロバイオティクスと口腔疾患
11. 坂上竜資 細胞培養技術を用いた歯と歯周組織の再生に関する研究
12. 佐藤博信 顎骨のコラーゲンの特異性に関する研究
13. 大星博明 脳血管障害と免疫・酸化ストレス

発表会冒頭に早川浩研究代表から本事業の趣旨に関する説明があった。それによると本事業は最近社会的にその重要性が注目されている「老化」に関する機構の解明とこれへの対応を研究の大命題として、アクティビティの高い研究者の個々の研究を強くサポートすることにより、当該施設即ち福岡歯科大学に強固な研究基盤を形成することを目指している。従って上記発表課題からも明らかなように、本事業の担い手は、老化に伴う（或はその原因となる）遺伝情報伝達機構のかく乱に関する分子生物学的研究、高齢者で特に問題となる口腔疾患の基礎及び臨床研究、さらには脳梗塞における障害の分子病態研究までの広範囲にわたる研究グループの混成部隊であり、個々に自由度の高い研究をしている。

発表された研究はいずれも高度に専門的知識と技術を駆使して行われており、これらの成果はそれぞれの分野で最高水準にある。そしてその成果はすでに一流の学術雑誌に数多くの論文として発表されている。これは本事業の充実ふりを如実に示すものである。

特筆すべきは、各研究課題とも比較的少人数の当事者によって遂行されているにも関わらず、世界最先端の技術を積極的に素早く採用し、自らのものとして有意義な成果を得ている。これは研究のモチベーションの高さと、個々の研究者の能力の高さの賜物であり、本事業の組織運営の正しさを証明している。また歯科大学という特徴が生かされ、歯科分野での研究が発展されていることも高く評価される。

この事業の第一回研究発表会（非公開）に比べて格段に研究が発展しており、外部研究者との共同研究も着実に充実しつつある。今後事業内各研究グループ間、及び国内外の異分野の研究者との交流の更なる拡大によって一層の研究の発展が期待される。海外での研究経験を持つ若い研究者の採用がなされたことにも、これからの更なる発展が予想される。唯一今後改善すべき点として、基礎の科学者と臨床の研究者の交流の機会を増加することにより、さらなる研究活動の活性化と成果が期待できるものと思われる。

このたびの研究報告会に、理事長及び学長の参加があり、大所高所からの適切な助言等を得ることができたことから、大学全体での研究向上への理解と意気込みがうかがえた。こうした研究の発展が、教育に反映され、新しい知識やより広い視野を持った歯科医の養成がなされることが期待される。

以上

2012年から2014年前半までの研究成果

発表論文

1. Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, Taniguchi M, Noguchi H, Nakano T, Masutani K, Ooboshi H, Tsuruya K, Kitazono T. Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *Am J Physiol. Renal. Physiol.* 査読有、306, F1418-1428 (2014)
2. Wakisaka Y, Ago T, Kamouchi M, Kuroda J, Matsuo R, Hata J, Gotoh S, Isomura T, Awano H, Suzuki K, Fukuda K, Okada Y, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T; REBIOS Investigators. Plasma S100A12 is associated with functional outcome after ischemic stroke: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke. *J. Neurol. Sci.* 査読有、340, 75-79 (2014)
3. Kiyohara T, Kamouchi M, Kumai Y, Ninomiya T, Hata J, Yoshimura S, Ago T, Okada Y, Kitazono T; Fukuoka Stroke Registry Investigators (Ooboshi H). ABCD3 and ABCD3-I scores are superior to ABCD2 score in the prediction of short- and long-term risks of stroke after transient ischemic attack. *Stroke* 査読有、45, 418-425 (2014)
4. Ishitsuka K, Kamouchi M, Hata J, Fukuda K, Matsuo R, Kuroda J, Ago T, Kuwashiro T, Sugimori H, Nakane H, Kitazono T; FSR Investigators (Ooboshi H). High blood pressure after acute ischemic stroke is associated with poor clinical outcomes: Fukuoka Stroke Registry. *Hypertension* 査読有、63, 54-60 (2014)
5. Morotomi T, Kitamura C, Okinaga T, Nishihara T, Sakagami R, Anan H. Fever-Range Heat Stress Induces Thermotolerance in Odontoblast-lineage cells, *Archives of oral biology* 査読有、59, 741-748 (2014)
6. Nishida E, Miyaji H, Takita H, Kanayama I, Tsuji M, Akasaka T, Sugaya T, Sakagami R, Kawanami M. Graphene oxide coating facilitates the bioactivity of scaffold material for tissue engineering, *Jpn. J. Appl. Phys.* 査読有、53 06JD04 doi:10.7567/JJAP.53.06JD04, (2014)
7. Matsuura T, Tokutomi K, Sasaki M, Katafuchi M, Mizumachi E, Sato H. Distinct characteristics of mandibular bone collagen relative to long bone collagen: relevance to clinical dentistry. *BioMed. Res. Int.* 査読有、DOI: 10.1155/2014/769414, (2014) (in press)
8. Matsuura T, Sasaki M, Katafuchi M, Tokutomi K, Mizumachi E, Makino M, Naito T, Sato H. Characterization of the bone matrix and its contribution to tooth loss in human cadaveric mandibles. *Acta Odontol. Scan.* 査読有、DOI: 10.3109/00016357.2014.903517, (2014) (in press)
9. Matsuura T., Mizumachi E, Katafuchi M, Tokutomi K, Kido H, Matsuura M, Sato H. Sex-related differences in cortical and trabecular bone quantities at the mandibular molar.

- J. Hard Tissue Biol. 査読有、23, 267-274 (2014)
10. Suzuki N, Yoneda M, Tanabe K, Fujimoto A, Iha K, Seno K, Yamada K, Iwamoto T, Masuo Y, Hirofujii T. *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets for the treatment of oral malodor: a double blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. Oral Surg, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. 査読有、117, 462-469 doi:10.1016/j.oooo. 2013.12.400. (2014)
 11. Nakano Y, Takeshita T, Kamio N, Shiota S, Shibata Y, Suzuki N, Yoneda M, Hirofujii T, Yamashita Y. Supervised machine learning-based prediction of oral malodor based on the microbiota in saliva samples. Art. Int. Med. 査読有、60, 97-101 (2014)
 12. 仲西宏介、鈴木奈央、米田雅裕、山田潤一、廣藤卓雄、口臭除去を効能とする口腔咽喉薬（トローチ剤）の臨床的評価、日歯保存誌 査読有、(2014) (in press)
 13. Suzuki N, Yoneda M, Haruna K, Masuo Y, Nishihara T, Nakanishi K, Yamada K, Fujimoto A, Hirofujii T. Effects of S-PRG eluate on oral biofilm and oral malodor. Archives of Oral Biology 査読有、59(4), 407-413 (2014).
 14. Hanada H, Ohno J, Seno K, Ota N, Taniguchi K. Dynamic changes in cell-surface expression of mannose in the oral epithelium during the development of graft-versus-host disease of the oral mucosa in rats. BMC Oral Health 査読有、15, 5 (2014)
 15. Ota N, Ohno J, Seno K, Taniguchi K, Ozeki S. In vitro and in vivo expression of aldehyde dehydrogenase 1 in oral squamous cell carcinoma. Int. J. Oncol. 査読有、44, 435-442 (2014)
 16. Sawa Y, Takata S, Hatakeyama Y, Ishikawa H, Tsuruga E. Expression of toll-like receptor 2 in glomerular endothelial cells and promotion of diabetic nephropathy by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. PLoS One 査読有、9, e97165 (2014)
 17. Wu X, Fukushima H, North BJ, Nagaoka Y, Nagashima K, Deng F, Okabe K, Inuzuka H, Wei W. SCFβ-TRCP regulates osteoclastogenesis via promoting CYLD ubiquitination. Oncotarget. 査読有、30, 4211-21 (2014)
 18. Sekiguchi T, Ito R, Hayakawa H, Sekiguchi M. Elimination and Utilization of Oxidized Guanine Nucleotides in the Synthesis of RNA and its Precursors. J. Biol. Chem. 査読有、288, 8128-35 (2013)
 19. Nie B, Gan W, Shi F, Hu GX, Chen LG, Hayakawa H, Sekiguchi M., Cai JP. Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 査読有、ID 303181, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/303181> (2013)
 20. Inokuchi H, Ito R, Sekiguchi T, Sekiguchi M. Search for protein required for accurate gene expression under oxidative stress: Roles of guanylate kinase and RNA polymerase. J. Biol. Chem. 査読有、288, No. 46, 32952-32962 (2013)
 21. Ota N, Izumi K, Okamoto Y, Toshitani K, Nakayama K, Fukuzawa H, Ozeki S, Ikebe T.

- Tapia's syndrome following the orthognathic surgery under general anaesthesia. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 査読有、 25, 52-54, (2013)
22. Sano S, Sakagami R, Sekiguchi M, Hidaka M. Stabilization of MAPO1 by specific binding with folliculin and AMP-activated protein kinase in O⁶-methylguanine-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 査読有、 430, 2, 810-815 (2013)
 23. Iha K, Suzuki N, Yoneda M, Takeshita T, Hirofuji T. Effect of mouth cleaning with hinokitiol-containing gel on oral malodor: a randomized, open-label pilot study. *Oral Surg, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 査読有、 116(4), 433-439. doi: 10.1016/j.oooo.2013.05.021. (2013)
 24. Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *Int. J. Dent.* 査読有、 2013, Article ID 587279, 6 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/587279> (2013)
 25. Murakami H, Okamura K, Aoki S, Sakagami R, Yamazaki J. Association of caspase-14 and filaggrin expression with keratinization of the oral mucosa and reconstruction culture rat models. *Journal of Periodontal Research* 査読有、 doi: 10.1111/jre.12152 (2013)
 26. Mori N, Ohno J, Sakagami R, Hayakawa T, Fukushima T. Cell viabilities and biodegradation rates of DNA/protamine complexes with two different molecular weights of DNA. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 査読有、 101, 743-751 (2013)
 27. Ohgi K, Kajiya H, Okamoto F, Nagaoka Y, Onitsuka T, Nagai A, Sakagami R, Okabe K. A novel inhibitory mechanism of nitrogen-containing bisphosphonate on the activity of Cl⁻ extrusion in osteoclasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 査読有、 386, 589-598 (2013)
 28. Namura S, Ooboshi H, Liu J, Yenari MA. Neuroprotection after cerebral ischemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 査読有、 1278, 25-32 (2013)
 29. Abe K, Uchiyama S, Matsubara E, Muramatsu S, Atsuta N, Kitagawa K, Iguchi Y, Ooboshi H, Kaji R, Terao Y. IT network establishment for neuropatients. *Rinsho Shinkeigak* 査読有、 53, 1155-1158 (2013)
 30. Seno K, Ohno J, Ota N, Horofuji T, Taniguchi K. Lupus-like oral mucosal lesions in mercury-induced autoimmune response in Brown Norway rat. *BMC Immunol.* 査読有、 14, 47 (2013)
 31. Nishimura S, Sawa Y. Risk factors to cause tooth formation anomalies in chemotherapy of paediatric cancers. *Eur. J. Cancer Care* 査読有、 22, 353-360 (2013)
 32. Takata S, Sawa Y, Expression of Toll-Like Receptor 4 in Glomerular Endothelial Cells under Diabetic Conditions. *Acta Histochem. Cytochem.* 査読有、 46, 35-42 (2013)
 33. Uchiyama , Sawa Y. Altered dynamics in the renal lymphatic circulation of type 1 and type

- 2 diabetic mice. *Acta Histochem. Cytochem.* 査読有、46, 97-104 (2013)
34. Tsutsumi T, Kajiya H, Fukawa T, Sasaki M, Nemoto T, Tsuzuki T, Takahashi Y, Fujii S, Maeda H, Okabe K. The potential role of transient receptor potential type A1 as a mechanoreceptor in human periodontal ligament cells. *Eur J Oral Sci.* 査読有、121, 538-44 (2013)
35. Tsutsumi T, Kajiya H, Goto KT, Takahashi Y, Okabe K. Hyperocclusion up-regulates CCL3 expression in CCL2- and CCR2-deficient mice. *J. Dent. Res.* 査読有、92, 65-70 (2013)
36. Shi F, Nie B, Gan W, Zhou XY, Takagi Y, Hayakawa H, Sekiguchi M, Cai JP. Oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in leukocytes, plasma and urine of *Macaca mulatta*: 8-oxoguanosine in urine is a useful marker for aging. *Free Radic. Res.* 査読有、46, 1093-98 (2012)
37. Shi F, Gan W, Nie B, Takagi Y, Hayakawa H, Sekiguchi M, Cai JP. Greater nucleic acids oxidation in the temporal lobe than the frontal lobe in SAMP8. *Neuroreport* 査読有、23, 508-512 (2012)
38. Gan W, Nie B, Shi F, Xu X, Jianchang Qian J, Takagi Y, Hayakawa H, Sekiguchi M, Cai JP. Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging. *Free Radical Biology & Medicine* 査読有、52, 1700-1707 (2012)
39. Zhang LQ, Dai DP, Gan W, Takagi Y, Hayakawa H, Sekiguchi M, Cai JP. Lowered Nudix type 5 (NUDT5) expression leads to cell cycle retardation in HeLa cells. *Mol. Cell. Biochem.* 査読有、363, 377-384 (2012)
40. Okamoto Y, Ohkubo T, Ikebe T, Yamazaki J. Blockade of TRPM8 activity reduces the invasion potential of oral squamous carcinoma cell lines. *Int. J. Oncol.* 査読有、40 1431-1440 (2012)
41. Ikebe T, Yamasaki K, Takamune Y, Nakayama H, Shinohara M. Reduced expression of nuclear factor kB in oral mucosa undergoing preoperative chemoradiotherapy. *Oral Science Int.* 査読有、9, 33-37, (2012)
42. Fukawa T, Kajiya H, Ozeki S, Ikebe T, Okabe K. Reactive oxygen species stimulates epithelial mesenchymal transition in normal human epithelial keratinocytes via TGF-beta secretion. *Exp. Cell Res.* 査読有、318, 1926-1932 (2012)
43. Tanaka T, Nakayama H, Yoshitake Y, Irie A, Nagata M, Kawahara K, Takamune Y, Yoshida R, Nakagawa Y, Ogi H, Shinriki S, Ota K, Hiraki A, Ikebe T, Nishimura Y, Shinohara M. Selective inhibition of nuclear factor-kB by nuclear factor-kB essential modulator-binding domain peptide suppresses the metastasis of highly metastatic oral

- squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 査読有、103, 455-463, (2012)
44. Fujikane R, Sanada M, Sekiguchi M, Hidaka M. The identification of a novel gene, MAPO2, that is involved in the induction of apoptosis triggered by O⁶-methylguanine. *PLoS ONE* 査読有、7, 9, e44817 (2012)
45. Lim TH, Fujikane R, Sano S, Sakagami R, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M, Hidaka M. Activation of AMP-activated protein kinase by MAPO1 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. *DNA Repair* 査読有、11, 259-266 (2012)
46. Masuo Y, Suzuki N, Yoneda M, Naito T, Hirofuji T. Salivary β -galactosidase activity affects physiological malodour. *Arch. Oral Biol.* 査読有、57(1), 87-93 (2012)
47. Takeshita T, Suzuki N, Nakano Y, Yasui M, Yoneda M, Shimazaki Y, Hirofuji T, Yamashita Y. Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production. *SCIENTIFIC REPORTS* 査読有、2, 215 DOI: 10.1038/srep00215 (2012)
48. Suzuki N, Tanabe K, Takeshita T, Yoneda M, Iwamoto T, Oshiro S, Yamashita Y, Hirofuji T. Effects of oil drops containing *Lactobacillus salivarius* WB21 on periodontal health and oral microbiota producing volatile sulfur compounds. *J. Breath Res.* 査読有、6, 017106 (7pp) doi:10.1088/1752-7155/6/1/017106 (2012)
49. Yoneda M, Suzuki N, Masuo Y, Fujimoto A, Iha K, Yamada K, Iwamoto T, Hirofuji T. Effect of S-PRG eluate on biofilm formation and enzyme activity of oral bacteria. *Int. J. Dent.* 査読有、2012, article ID 814913, 6pages, doi:10.1155/2012/814913. (2012)
50. Yoneda M, Suzuki N, Macedo SM, Fujimoto A, Iha K, Koga C, Matsuura M, Hirofuji T. The variable etiology of oral pathologic halitosis: a case series. *Smile Dental Journal* 査読有、7 (3), 50-56 (2012)
51. Yoneda M, Kashio N, Uchida H, Suzuki N, Matsuura H, Naito T, Koga C, Yasukochi H, Matsuura M, Hirofuji T. Awareness among dental hygienists with regard to treatment options for halitosis. *Int. J. Clin. Prev. Dent.* 査読有、8 (3), 173-179 (2012)
52. 米田雅裕、古賀千尋、鈴木奈央、高向和宣、内藤徹、豊村研吾、金光芳郎、廣藤卓雄、口臭恐怖のため精神科病院での入院加療を要した症例、*日本歯科心身医学会雑誌* 査読有、27(1, 2), 31-36 (2012)
53. 畑野優子、鈴木奈央、米田雅裕、廣藤卓雄 乳酸菌配合歯磨剤（アバンビーズ）の口腔衛生改善効果についての臨床研究、*日歯保存誌* 査読有、55(3), 219-226 (2012).
54. Kuboki T, Ichikawa T, Baba K, Hideshima M, Sato Y, Wake H, Nagao K, Ueda Y, Ono Y, Tamaki K, Tsuga K, Sakurai K, Sato H, Ishibashi K, Yatani H, Ohyama T, Akagawa Y, Hirai T, Sasaki K, Koyano K. A multi-centered epidemiological study evaluating the reliability of the treatment difficulty indices developed by the Japan Prosthodontic Society.

- J. Prosthodont. Res. 査読有、 56, 71-86 (2012)
55. Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. J. Neurochem. 査読有、 123S2, 29-38 (2012)
56. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K, Yoshimura A. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. Nat. Med. 査読有、 18, 911-917 (2012)
57. Arimura K, Ago T, Kamouchi M, Nakamura K, Ishitsuka K, Kuroda J, Sugimori H, Ooboshi H, Sasaki T, Kitazono T. PDGF receptor β signaling in pericytes following ischemic brain injury. Curr. Neurovasc. Res. 査読有、 9, 1-9 (2012)
58. Kuwashiro T, Sugimori H, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T; FSR Investigators (Ooboshi H). Risk factors predisposing to stroke recurrence within one year of non-cardioembolic stroke onset: the Fukuoka Stroke Registry. Cerebrovasc. Dis. 査読有、 33, 141-149 (2012)
59. Ozasa R, Ohno J, Iwahashi T, Taniguchi K. Tumor-induced lymphangiogenesis in cervical lymph nodes in oral melanoma-bearing mice. J. Exp. Clin. Cancer Res. 査読有、 31, 83 (2012)
60. Kaji C, Kato Y, Sawa Y. The expression of podoplanin and classic cadherins in the mouse brain. J. Anat. 査読有、 220, 435-446 (2012)
61. Yamanouchi K, Tsuruga E, Oka K, Sawa Y. Fibrillin-1 and fibrillin-2 are essential for Formation of thick oxytalan fibers in human nonpigmented ciliary epithelial cells in vitro. Connect. Tissue Res. 査読有、 53, 14-20 (2012)
62. Nakatomi Y, Tsuruga E, Sawa Y. Intracellular interaction of EMILIN-1 with fibrillin-1 in human periodontal ligament cells. Orthodontic Waves 査読有、 71, 66-69 (2012)
63. Tsuruga E, Oka K, Hatakeyama Y, Sawa Y. Latent transforming growth factor- β binding protein 2 negatively regulates coalescence of oxytalan fibers induced by stretching stress. Connect Tiss. Res. 査読有、 53, 521-527 (2012)
64. Kaji C, Tsujimoto Y, Kaneko, MK, Kato Y and Sawa Y. Immunohistochemical examination of novel rat monoclonal antibodies against mouse and human podoplanin. Acta Histochem. Cytochem. 査読有、 45, 227-237 (2012)
65. Kaneko MK, Sawa Y, Kato Y. A chimeric anti-podoplanin antibody suppresses tumor metastasis via neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity. Cancer Sci. 査読有、 103, 1913-1919 (2012)

66. Oka K, Tsuruga T, Hatakeyama Y, Sawa Y. Roles of collagen and periostin expression by cranial neural crest cells during soft palate development. *J. Histochem. Cytochem.* 査読有、60, 57-68 (2012)
67. Oka K, Sawa Y, Cellular turnover in epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament of the mouse molar. *Eur. J. Oral Sci.* 査読有、120, 484-494 (2012)
68. Okabe K, Okamoto F, Kajiya H. Odontoclasts and calcitonin. *Clin. Calcium.* 査読有、22, 19-26 (2012)
69. Masuyama R, Mizuno A, Komori H, Kajiya H, Uekawa A, Kitaura H, Okabe K, Ohyama K, Komori T. Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass. *J. Bone Miner. Res.* 査読有、27, 1708-21 (2012)

図書

1. Oral Health Care-Prosthodontics, Periodontology, Biology, Research and Systemic Conditions (ISBN 978-953-51-0040-9) Chapter 9: Relationship between oral malodor and oral microbiota Authors: N. Suzuki, M. Yoneda and T. Hirofuji. Edt by Mandeep Singh Viridi. In Tech (Croatia), pp 121-130, 2012

学会発表

1. 佐々木三奈、森紘一郎、永寫勝之、田中文恵、長岡良礼、永沼香織、勝俣由里、太田信敬、府川晃久、利谷幸治、橋本憲一郎、泉喜和子、内田竜司、池邊哲郎、大関悟 正常角化上皮細胞の上皮間葉移行における **IKKalpha** シグナルの関与。第 68 回日本口腔科学会学術集会、2014 年 5 月 8 日 東京
2. 佐々木三奈、永沼香織、竹山顕子、勝俣由里、太田信敬、府川晃久、岡本愛彦、橋本憲一郎、池邊哲郎、大関悟 酸化ストレスに対するがん抑制遺伝子 p16 の発現調節を介する細胞老化誘導作用。第 32 回日本口腔腫瘍学会学術集会、2014 年 1 月 24 日 札幌市
3. 平川沙弥香、吉村武、武田篤信、大島裕司、川野庸一、石橋達朗 実験的自己免疫性ぶどう膜炎における IL-27 および IL-35 の役割。第 118 回日本眼科学会総会、2014 年 4 月 東京都
4. 藤本暁江、谷口奈央、伊波幸作、米田雅裕、山田和彦、瀬野恵衣、廣藤卓雄 ヒノキチオールの *Porphyromonas gingivalis* に対する抗菌作用と口臭改善効果について。第 55 回日本歯科医療管理学会総会・学術大会、2014 年 7 月 18-20 日 札幌市
5. 仲西宏介、鈴木奈央、藤本暁江、伊波幸作、瀧井 慶、福地浩文、米田雅裕、廣藤卓雄 口臭の除去を効能とする口腔咽喉薬の臨床的評価。第 5 回日本口臭学会、2014 年 7 月 東大阪市
6. 山田潤一、鈴木奈央、仲西宏介、伊波幸作、藤本暁江、瀧井慶、米田雅裕、山田和彦、榊尾陽

- 介、萩尾佳那子、廣藤卓雄 3種の有効成分を配合した口腔咽喉薬の口臭抑制効果。第140回日本歯科保存学会春季学術大会、2014年6月19-20日 大津市
7. 西原哲世、鈴木奈央、藤本暁江、米田雅裕、田邊一成、山田和彦、岩元知之、安 忠大、伊波幸作、瀬野恵衣、廣藤卓雄 乳酸菌配合タブレットがう蝕リスク因子に与える影響の臨床的評価。第140回日本歯科保存学会春季学術大会、2014年6月19-20日 大津市
 8. 瀬野恵衣、大野純、山田和彦、谷口奈央、廣藤卓雄、ラット歯肉炎モデルでの免疫応答-なぜ臨床的態度に違いが出るのか? 第140回日本歯科保存学会春季学術大会、2014年6月19-20日 大津市
 9. 鈴木奈央、米田雅裕、田邊一成、廣藤卓雄 乳酸桿菌 *Lactobacillus salivarius* 配合タブレットがう蝕リスク因子に与える影響。第63回日本口腔衛生学会総会、2014年5月29-31日 熊本市
 10. 上村吏絵、米田雅裕、草場裕美、岩村裕美、杉本由紀子、大家知子、鈴木奈央、廣藤卓雄 福岡歯科大学口腔医療センター口臭クリニックの患者分析、第57回日本歯周病学会春季学術大会、平成26年5月22-24日 岐阜市
 11. Nakamura K, Ago T, Arimura K, Makihara N, Nishimura A, Matsuo R, Kuroda J, Wakisaka Y, Isomura T, Awano H, Suzuki K, Okada Y, Kamouchi M, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T. Basic fibroblast growth factor after ischemic stroke in diabetic patients - Research for Biomarkers in Ischemic Stroke (REBIOS) -. International Stroke Conference 2014, 2014年2月 San Diego
 12. 瀬野恵衣、大野純、廣藤卓雄、谷口邦久 オートファジー抑制による口腔扁平上皮癌の cancer sphere 形成能の変化。第103回日本病理学会、2014年4月 広島市
 13. 大野純、瀬野恵衣、谷口邦久 T細胞免疫応答型口腔粘膜病変におけるエフェクター細胞の上皮親和性機構。第103回日本病理学会、2014年4月 広島市
 14. 高田俊輔、梶原弘一郎、沢禎彦、石川博之 糖尿病マウス腎糸球体における歯周病原菌由来 LPS による TLR2/4 依存性サイトカイン発現。日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会、2014年5月 千葉市
 15. 高田俊輔、梶原弘一郎、沢禎彦、石川博之 Severe Periodontal Disease exacerbate Diabetic Nephropathy through Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. 第57回春季日本歯周病学会学術集会、2014年5月 岐阜市
 16. Sawa Y, Takata S, Ishikawa H, Hatakeyama Y, Tsuruga E. Promotion of nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in diabetic kidney. J. Dent. Res. 92(S). 92th International Association of Dental Research, 2014年6月 Cape Town
 17. 福島秀文、岡本富士雄、鍛冶屋浩、自見英治郎、岡部幸司 ユビキチンリガーゼ SCF/β-TRCP は、脱ユビキチン化酵素 CYLD の量的制御を介して破骨細胞分化を促進する。第32回日本骨代謝学会、2014年7月 大阪市
 18. 都築尊、鍛冶屋浩、後藤加寿子、堤貴司、岡部幸司 メカニカルストレスによる歯根膜組織のコラーゲン産生能の加齢による変化。第32回日本骨代謝学会、2014年7月 大阪市

19. 長岡良礼、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、福島秀文、岡部幸司 窒素含有ビスホスホネート製剤 (NBP)による破骨細胞の融合阻害を介する分化阻害作用。第 32 回日本骨代謝学会、2014 年 7 月 大阪市
20. 福島秀文、犬塚博之、岡本富士雄、鍛冶屋浩、岡部幸司 細胞周期における SCF/ β -TRCP による Cdh1 の量的制御機構。第 91 回日本生理学会、2014 年 3 月 鹿児島市
21. 片桐千秋、圓谷智之、岡本富士雄、岡部幸司、松下正之 象牙芽細胞における TRPM7 の発現解析。第 91 回日本生理学会、2014 年 3 月 鹿児島市
22. 鍛冶屋浩、大城希美子、岡本富士雄、岡部幸司 フェーネシル合成酵素による破骨細胞 Cl⁻ 輸送体調節。第 91 回日本生理学会、2014 年 3 月 鹿児島市
23. Hiroshi Hayakawa Proteins that recognize oxidative RNA damage。第 86 回日本生化学会大会、インターナショナルシンポジウム: Gene Expression under Oxidative Stress 03-1IS15a 2013 年 9 月 横浜市
24. 井口八郎、伊東理世子、関口猛、関口睦夫 酸素ストレス下の遺伝子発現機構。日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 横浜市
25. 伊東理世子、井口八郎、関口猛、関口睦夫 大腸菌における 8-オキソグアニンを含むヌクレオチドの排除機構。日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 横浜市
26. 日高真純、佐野しおり、坂上竜資、関口睦夫 アポトーシス誘導過程の MAPO1 の安定化は FLCN と AMPK により制御される。第 85 回大会日本遺伝学会、2013 年 9 月、横浜市
27. 佐々木三奈、長岡良礼、永沼香織、太田信敬、府川晃久、中山修二、山下善弘、大関悟 池邊哲郎 酸化ストレスに対するがん抑制遺伝子を介した細胞老化誘導作用。第 67 回日本口腔科学会学術集会、2013 年 5 月 23 日 宇都宮市
28. 林道夫、石橋一成、梅津桂子 クロマチンリモデリング因子とゲノムの安定な維持: Cse4 を介した Rdh54 の機能。第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 神戸市
29. 石橋一成、林道夫、梅津桂子 酸化ストレスによるアポトーシス: ウェルナー症候群原因遺伝子 WRN の欠損による増強。第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 神戸市
30. 瀬野恵衣、大野純、山田和彦、谷口奈央、廣藤卓雄 ラット全身性免疫応答モデルにおける歯肉炎の病態。第 139 回日本歯科保存学会秋期学術大会、2013 年 10 月 17-18 日 福岡市
31. 瀬野恵衣、大野純、山田和彦、谷口奈央、谷口邦久、廣藤卓雄 オートファジーと cancer sphere 形成能の関連。第 40 回福岡歯科大学学会、2013 年 12 月 15 日 福岡市
32. 岩元知之、鈴木奈央、米田雅裕、山田和彦、榊尾陽介、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、廣藤卓雄 プロバイオティクスを用いた口腔疾患の予防管理への取り組み。歯科人間工学会、2013 年 11 月 22-23 日 名古屋市
33. 瀬野恵衣、大野純、山田和彦、谷口奈央、廣藤卓雄、総合歯科診療科における細胞診の実践。総合歯科協議会、2013 年 11 月 16-17 日 東京
34. 伊波幸作、鈴木奈央、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、藤本暁江、瀬野恵衣、

- 春名一人、安忠大、入江丹佳子、西原哲世、仲西宏介、廣藤卓雄 ヒノキチオール配合ジェルを用いた口腔ケアの口臭改善効果、総合歯科協議会、2013年11月16-17日 東京
35. 藤本暁江、米田雅裕、鈴木奈央、内藤徹、山田潤一、廣藤卓雄 口臭恐怖のため精神科病院での加療を要した症例、日本歯科保存学会、2013年10月17-18日 秋田市
36. 春名一人、鈴木奈央、米田雅裕、山田潤一、榊尾陽介、西原哲世、仲西宏介、山田和彦、岩元知之、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、安忠大、入江丹佳子、廣藤卓雄、S-PRG 溶出液が口腔バイオフィルムと口臭に及ぼす阻害作用。日本歯科保存学会、2013年10月17-18日 秋田市
37. Suzuki N, Yoneda M, Tanabe K, Fujimoto A, Iha K, Seno K, Iwamoto T, Yamada K, Masuo Y, Haruna K, and Hirofujii T, Improvement of oral malodor using *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets. WCPD, 2013年10月9-12日 Butapest
38. 藤本暁江、鈴木奈央、米田雅裕、伊波幸作、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、瀬野恵衣、廣藤卓雄、口臭関連細菌に対するヒノキチオールの抗菌作用とヒノキチオール配合ジェルによる口腔ケアの口臭改善効果。第4回日本口臭学会、2013年7月13-14日 横浜市
39. 伊波幸作、鈴木奈央、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、藤本暁江、瀬野恵衣、春名一人、安忠大、入江丹佳子、西原哲世、仲西宏介、廣藤卓雄 ヒノキチオール配合ジェルを用いた口腔ケアが口臭及び口腔内環境に与える影響、第138回日本歯科保存学会春季学術大会、2013年6月27-28日 福岡市
40. 松浦洋志、米田雅裕、鈴木奈央、岡田芙美子、藤本暁江、廣藤卓雄 長期間悩まされていた口腔異常感が口腔乾燥に対する処置で消失した症例。第138回日本歯科保存学会春季学術大会、2013年6月27-28日 福岡市
41. Mori N, Washino K, Iwata T, Yoshida T, Fukushima T, Sakagami R, Yamato M, Okano T. Optimal conditions for creating rat periodontal ligament-derived multipotent mesenchymal stromal cell (RPDL-MSC) sheets . 12thCELL TRANSPLANT SOCIETY, 2013年 Milan
42. 松浦尚志、佐々木美智子、水町栄美理、片渕三千綱、佐藤博信 下顎骨の主要骨基質成分の部位特異性 ―四肢骨との比較―。日本口腔インプラント学会第30回九州支部学術大会、2013年1月 別府市
43. Nakamura K, Arimura K, Ago T, Makihara N, Isomura T, Watabe W, Awano H, Suzuki K, Kamouchi M, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T. The expression of pericyte PDGFR β is regulated by basic FGF after ischemic stroke - Research for Biomarkers in Ischemic Stroke (REBIOS) -. Neuroscience Meeting 2013, 2013年11月 San Diego
44. Yamada S, Tokumoto M, Taniguchi M, Tsuruya K, Ooboshi H, Kitazono T. Phosphate overload induces systemic inflammation, malnutrition, and vascular calcification in uremia. ASN Kidney Week 2013, 2013年11月 Atlanta
45. Tokumoto M, Yamada S, Fujino T, Tsuruya K, Kitazono T, Ooboshi H. The combined

therapy with calcitriol and a calcimimetic agent, R568, ameliorates phosphorus-induced calcification with altered expression of SIRT1 and ALP in human vascular smooth muscle cells. ASN Kidney Week 2013, 2013 年 11 月 Atlanta

46. 中村晋之、吾郷哲朗、有村公一、牧原典子、栗野秀人、鈴木一夫、清原裕、鴨打正浩、大星博明、北園孝成 脳梗塞発症後の糖尿病患者における basic FGF の上昇: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke (REBIOS). 日本脳循環代謝学会総会、2013 年 11 月札幌市
47. 脇坂義信、吾郷哲朗、鴨打正浩、磯村哲、栗野秀人、鈴木一夫、岡田靖、清原裕、大星博明、北園孝成 脳梗塞後の S100A12 血漿濃度は昨日予後不良と挿管する: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke. 第 38 回日本脳卒中学会総会、2013 年 3 月 東京
48. Wakisaka Y, Ago T, Kamouchi M, Kuroda J, Matsuo R, Gotoh S, Watanabe W, Isomura T, Awano H, Suzuki K, Fukuda K, Okada Y, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T. Extracellular newly identified receptor for advanced glycation endproducts binding protein (EN-RAGE) predicts the outcome in patients with acute ischemic stroke: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke. International Stroke Conference 2013, 2013 年 2 月 Honolulu
49. 瀬野恵衣、大野純、太田信敬、廣藤卓雄、谷口邦久 オートファジー制御による cancer sphere 形成能. 第 24 回日本臨床口腔病理学会、013 年 8 月 東京
50. 大野純、瀬野恵衣、太田信敬、谷口邦久 オートファジー制御による口腔扁平上皮癌細胞の動態. 第 102 回日本病理学会、2013 年 6 月 札幌市
51. 太田信敬、大野純、瀬野恵衣、谷口邦久 エナメル上皮癌と癌腫に類似像を含有するエナメル上皮腫の 2 例. 第 102 回日本病理学会、札幌、2013 年 6 月.
52. 加地千晶、友岡みわ、畠山雄次、敦賀英知、小島寛、沢禎彦 正常マウスグリア細胞が発現するポドプラリンとカドヘリン. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 3 月 高松市
53. 高田俊輔、内山貴誠、敦賀英知、畠山雄次、石川博之、沢禎彦 糖尿病環境下の腎系球体における TLR2 と TLR4 の発現について. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 3 月 高松市
54. 内山貴誠、高田俊輔、敦賀英知、畠山雄次、石川博之、沢禎彦 糖尿病モデルマウスの腎リンパ管増生について. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 3 月 高松市
55. 高田俊輔、内山貴誠、敦賀英知、畠山雄次、石川博之、沢禎彦 Expression of toll-like receptors in glomerular endothelial cells under diabetic conditions. 第 38 回日本微小循環学会総会、2013 年 2 月 東京
56. 高田俊輔、内山貴誠、石川博之、沢禎彦 糖尿病モデルマウス腎系球体における TLR2 と TLR4 発現. 第 28 回日本糖尿病合併症学会、2013 年 9 月 旭川市
57. 内山貴誠、高田俊輔、敦賀英知、畠山雄次、石川博之、沢禎彦 I 型と II 型糖尿病モデルマ

- スにおける腎リンパ管新生。第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013 年 9 月 岡山市
58. 高田俊輔、内山貴誠、敦賀英知、畠山雄次、石川博之、沢禎彦 糖尿病環境下の腎糸球体内皮細胞における TLR2 と TLR4 の発現。第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013 年 9 月 岡山市
 59. 内山貴誠、高田俊輔、石川博之、沢禎彦 I 型と II 型糖尿病マウスにおける腎リンパ管増生について。第 51 回日本糖尿病学会九州地方会、2013 年 11 月 沖縄市
 60. 高田俊輔、内山貴誠、敦賀英知、畠山雄次、石川博之、沢禎彦 糖尿病環境下の腎糸球体における Toll-like receptor(TLR)2 と 4 の発現。第 51 回日本糖尿病学会九州地方会、2013 年 11 月 沖縄市
 61. 内山貴誠、高田俊輔、石川博之、沢禎彦 I 型と II 型糖尿病モデルマウスにおける腎リンパ管新生について。第 40 回福岡歯科大学学会総会、2013 年 12 月 福岡市
 62. 高田俊輔、内山貴誠、石川博之、沢禎彦 糖尿病モデルマウスの腎糸球体における TLR2 と TLR4 の発現。第 40 回福岡歯科大学学会総会、2013 年 12 月 福岡市
 63. 川越慈、山之内香、中富佑香、中島一記、敦賀英知、沢禎彦、石川博之 ヒト歯根膜線維芽細胞によるオキシタラン線維の分解過程。第 8 回九州矯正歯科学会学術大会、2013 年 2 月 北九州市
 64. 山之内香、敦賀英知、沢禎彦、石川博之 歯根膜オキシタラン線維形成における MAGP-1 の機能。第 56 回春季日本歯周病学会学術大会、2013 年 5 月 東京
 65. 川越慈、敦賀英知、沢禎彦、石川博之 ヒト歯根膜オキシタラン線維の分解機構。第 56 回春季日本歯周病学会学術大会、2013 年 5 月 東京
 66. 藤田隆寛、山之内香、中富佑香、中島一記、敦賀英知、沢禎彦、石川博之 オキシタラン線維の形成機構における MAGP-1 の機能解析。第 72 回日本矯正歯科学会大会、2013 年 10 月 長野市
 67. 川越慈、山之内香、中富佑香、中島一記、敦賀英知、沢禎彦、石川博之 ヒト歯根膜オキシタラン線維の改造機構。第 72 回日本矯正歯科学会大会、2013 年 10 月 長野市
 68. 山之内香、川越慈、中富佑香、中島一記、敦賀英知、沢禎彦、石川博之 ヒト無色素毛様体上皮細胞によるオキシタラン線維形成の解析。日本解剖学会第 69 回九州支部学術集会、2013 年 11 月 鹿児島市
 69. 西村紗和、沢禎彦、稲田浩子、上田耕一郎、石川博之、水田祥代 小児がん治療後の歯科的長期フォローアップ。第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム、2013 年 12 月 福岡市
 70. Tsutsumi T, Kajiyama H, Goto K, Takahashi Y, Okabe K. Expression of C-C chemokine ligands for osteoclastogenesis induced by hyperocclusion. アメリカ骨代謝学会・2013 年学術集会、2013 年 10 月 ボルチモア
 71. Kajiyama H, Tsutsumi T, Nagaoka Y, Goto K, Fukawa T, Sasaki M, Okamoto F, Okabe K. A

- novel role of farnesyl diphosphate synthetase (FDPS) on the activity of Cl⁻ extrusion in osteoclasts. アメリカ骨代謝学会・2013年学術集会、2013年10月 ボルチモア
72. 福島秀文、鍛冶屋浩、岡本富士雄、自見英治郎、岡部幸司 Notch2のHadju-Cheney症候群型変異はSCF/FBW7によるタンパクの量的制御を免れる。第64回西日本生理学会、2013年10月 北九州市
73. 長岡良礼、鍛冶屋浩、佐々木三奈、永沼香織、堤貴司、府川晃久、岡本富士雄、岡部幸司 窒素含有ヒスホスホネート製剤(NBP)による破骨細胞の細胞融合阻害作用。第55回歯科基礎医学会、2013年9月 岡山市
74. Tsutsumi T, Kajiya H, Goto K, Nagaoka Y, Okamoto F, Okabe K. The novel roles of CCL2 and CCL3 on osteoclast differentiation and alveolar bone resorption during occlusal traumatism. 国際骨代謝学会 (IBMS)・日本骨代謝学会 (JSBMR) 第2回合同国際会議、2013年5月 神戸市
75. Okamoto F, Kajiya H, Okabe K. The properties of Mg²⁺-inhibited TRPM7-like channel in mouse osteoclasts. 第90回日本生理学会、2013年3月 東京
76. 佐野しおり、坂上竜資、関口睦夫、日高真純 アポトーシス誘導過程におけるMAPO1タンパク質の安定化。第35回日本分子生物学会年会、2012年12月 福岡市
77. 日高真純、佐野しおり、藤兼亮輔、林徳豪、坂上竜資、中津可道、續輝久、関口睦夫 発がんを抑制するアポトーシスの誘導機構。第35回日本分子生物学会年、2012年12月 福岡市
78. Fujikane R, Sanada M, Sekiguchi M, Hidaka M. The identification of a novel gene, MAPO2, that is involved in the induction of apoptosis triggered by O⁶-methylguanine. The 8th 3R Symposium, 2012年11月 淡路市
79. 日高真純、林徳豪、藤兼亮輔、佐野しおり、坂上竜資、中津可道、續輝久、関口睦夫 MAPO1とFLCNによるAMPKの活性化はアポトーシスを誘導する。第84回大会日本遺伝学会、2012年9月 福岡市
80. 中野善夫、鈴木奈央、米田雅裕、廣藤卓雄、横瀬勝美、桑田文幸 ヒト口腔内細菌叢の構成に対する亜鉛イオンの影響。第85回日本生化学会大会、2012年12月14-16日 福岡市
81. 杉本由紀子、米田雅裕、鈴木奈央、廣藤卓雄 不適合修復物の除去および歯周外科により口臭が完全に消失した症例。第55回日本歯周病学会学術大会、2012年9月23日 つくば市
82. 松浦洋志、米田雅裕、鈴木奈央、内藤徹、廣藤卓雄 口臭治療についての意識-歯科衛生士を対象とした調査結果-。第137回日本歯科保存学会秋季学術大会、2012年11月22-23日 広島市
83. 榎尾陽介、鈴木奈央、米田雅裕、安忠大、仲西宏介、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、山田和彦、岩元知之、廣藤卓雄 S-PRG溶出液とS-PRG配合歯面研磨剤の口腔バイオフィルムへの影響。第137回日本歯科保存学会秋季学術大会、2012年11月22-23日 広島市
84. 伊波幸作、鈴木奈央、藤本暁江、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榎尾陽介、西原哲世、金子

- 元気、春名一人、廣藤卓雄、ヒノキチオール配合口腔ケア用ジェルによる口腔清掃の口臭改善効果、第137回日本歯科保存学会秋季学術大会、2012年11月22-23日 広島市
85. 梶尾陽介、鈴木奈央、米田雅裕、安忠大、仲西宏介、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、山田和彦、岩元知之、廣藤卓雄 S-PRG イオン溶出液と S-PRG 配合歯面研磨剤の口腔バイオフィルムへの影響。第39回福岡歯科大学学会総会、2012年11月18日 福岡市
86. 伊波幸作、鈴木奈央、藤本暁江、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、梶尾陽介、西原哲世、金子元気、春名一人、廣藤卓雄 ヒノキチオール配合口腔ケア用ジェルによる口臭改善効果の臨床研究。第39回福岡歯科大学学会総会、2012年11月18日 福岡市
87. 加塩奈津希、米田雅裕、内田初美、鈴木奈央、内藤徹、縄田和歌子、黒田美和子、力武紗由美、廣藤卓雄 口臭治療に関する歯科衛生士の意識調査。第39回福岡歯科大学学会総会、11.18, 2012年11月18日 福岡市
88. 米田雅裕、古賀千尋、鈴木奈央、内藤徹、廣藤卓雄 福岡歯科大学口腔医療センター口臭科の患者解析および口臭恐怖症の1症例。第27回日本歯科心身医学会総会・学術大会、2012年9月1-2日 川崎市
89. 藤本暁江、鈴木奈央、米田雅裕、伊波幸作、田邊一成、山田和彦、岩元知之、梶尾陽介、廣藤卓雄 真性口臭症における *Lactobacillus salivarius* WB21 株配合錠菓の有用性の検討。第3回日本口臭学会、2012年7月7-8日 東京
90. 鈴木奈央、中野善夫、米田雅裕、横瀬勝美、桑田文幸、廣藤卓雄 塩化亜鉛溶液の洗口による口腔内細菌叢の変動。第3回日本口臭学会、2012年7月7-8日 東京
91. 鈴木奈央、中野善夫、畑野優子、米田雅裕、横瀬勝美、桑田文幸、廣藤卓雄 塩化亜鉛曝露による口腔細菌構成の変化。第136回日本歯科保存学会春季大会、2012年6月28-29日 宜野湾市
92. 藤本暁江、鈴木奈央、米田雅裕、田邊一成、山田和彦、岩元知之、梶尾陽介、伊波幸作、廣藤卓雄 *Lactobacillus salivarius* WB21 株配合錠菓の口臭抑制効果についての臨床研究～ランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験～。第136回日本歯科保存学会春季大会、2012年6月28-29日 宜野湾市
93. 加塩奈津希、米田雅裕、内田初美、鈴木奈央、内藤徹、村上早苗、安河内ひとみ、廣藤卓雄 口臭治療に関する歯科衛生士の意識調査。第55回日本歯周病学会春季大会、2012年5月17-19日 札幌市
94. Ohgi K, Kajiya H, Okamoto F, Tsusumi T, Onitsuka T, Nagai A, Sakagami R, Okabe K. Bisphosphonate as a novel target to the Clcn7 Cl⁻ transporter in osteoclasts. 第89回日本生理学会大会、2012年3月 松本市
95. 村上弘、岡村和彦、坂上竜資、山崎純 ラット口腔粘膜再構築系における重層化・角化上皮でのカスパーゼ14の発現。第85回日本薬理学会年会、2012年3月 京都
96. Murakami H, Okamura K, Sakagami R, Yamazaki J. Expression of caspase-14 in stratified

- and cornified epithelium in a rat oral mucosal reconstruction model. 第 85 回日本薬理学会
年会、2012 年 3 月 京都
97. 丸尾直樹、岡村和彦、谷口邦久、坂上竜資 マウス下顎切歯根尖部の多能性幹細胞における Sox2
の発現. 第 39 回福岡歯科大学学会、2012 年 11 月 18 日 福岡市
98. 廣松亮、八田光世、坂上竜資、山崎純 培養上皮細胞における Cl-チャンネル調節因子の遺伝子
発現解析. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月 郡山市
99. 大城希美子、岡部幸司、鬼塚得也、永井淳、坂上竜資 窒素含有ビスフォスフォネート(NBPs)
は破骨細胞 CIC7 型 Cl-輸送体 (Clcn7) の機能を抑制する。第 55 回日本歯周病学会春季学術大
会、2012 年 5 月 札幌市
100. 村上弘、岡村和彦、山崎純、坂上竜資 Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) による口腔粘膜
の分化に対する影響。第 55 回日本歯周病学会春季学術大会、2012 年 5 月 札幌市
101. Sakagami R, Nagai A, Kaneko N. Surface roughness of cures sharpened by diamond
dressers. American academy of periodontology 98th annual meeting, 2012 年 9-10 月 Los
Angels
102. Nagai A, Sakagami R Phylogenetic mapping of chronic periodontitis- associated microbiota
to the human microbiome. American academy of periodontology 98th annual meeting, 2012
年 9-10 月 Los Angeles
103. 松浦尚志、佐々木美智子、片瀨三千綱、徳富健太郎、石川美咲、新田悟、水町栄美理、佐藤博
信 骨コラーゲンが歯の寿命に寄与する可能性。第 121 回日本補綴歯科学会、2012 年 5 月 横
浜市
104. 松浦尚志、片瀨三千綱、徳富健太郎、新田悟、佐藤博信 ヒト献体下顎骨における骨基質中の
コラーゲン量と残存歯数の関係。日本口腔インプラント学会第 29 回九州支部学術大会、2012
年 1 月 宮崎市。
105. Ooboshi H. Innate immunity as a novel therapeutic target of brain infarction. Transpacific
Workshop on Stroke, 2012 年 10 月 New Orleans
106. 大星博明 Immune response as a novel therapeutic target of brain infarction. 第 44 回日本
動脈硬化学会、2012 年 7 月 福岡市
107. 大野純、岩橋輝明、谷口邦久 ConA による口腔扁平上皮癌細胞へのオートファジー誘導。第
101 回日本病理学会、2012 年 4 月 東京
108. 加地千晶、友岡みわ、小島寛、沢禎彦 マウス脈絡叢におけるポドプラニンとカドヘリンの発
現。第 37 回日本微小循環学会総会、2012 年 3 月 盛岡市
109. 畠山雄次、畠山純子、岡暁子、敦賀英知、稲井哲一郎、沢禎彦 成長板軟骨におけるアメロジ
ェニンおよび LAMP-1 の免疫組織学的研究。第 44 回日本結合組織学会、2012 年 6 月 東京
110. 畠山雄次、畠山純子、岡暁子、敦賀英知、稲井哲一郎、沢禎彦 歯根膜形成における
Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1)の免疫組織化学的局在について第 54 回
歯科基礎医学会学術大会・総会、2012 年 9 月 郡山市

- 111.山内由宣、中富佑香、中島一記、敦賀英知、沢禎彦、石川博之 Fibulin-4 は LOXL-2/エラスチン複合体形成を調節する。第 44 回日本結合組織学会、2012 年 6 月 東京
- 112.山之内香、川越慈、中富佑香、中島一記、敦賀英知、沢禎彦、石川博之 毛様体形成において Fibrillin-1 と Fibrillin-2 は必須である。第 44 回日本結合組織学会、2012 年 6 月 東京
- 113.中富佑香、敦賀英知、山内由宣、中島一記、沢禎彦、石川博之 EMILIN-1 は Fibrillin-1 と細胞内で結合してオキシタラン線維の形成量を調節している。第 44 回日本結合組織学会、2012 年 6 月 東京
- 114.西村紗和、稲田浩子、沢禎彦、石川博之 小児癌の抗癌剤治療が引き起こす永久歯の形成障害について。第 39 回福岡歯科大学学会総会、2012 年 12 月 福岡市
- 115.Kaji C, Tomooka M, Kojima H, Sawa Y. Distribution of Podoplanin Expressing Cells in the Oral Tissue. J. Dent. Res. 90(S) 90th Interbational Association of Dental Research, 2012 年 7 月 Iguacu Falls
- 116.Tomooka M, Kaji C, Kojima H, Sawa Y. Podoplanin expression on the peripheral nerves and central nervous system. The 60th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2012 年 12 月 新潟市
- 117.Uchiyama, T., Kojima, H., Ishikawa, H., Sawa, Y.:Immunohistochemistry for oral tissue by a novel antibody to podoplanin. The 60th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2012 年 12 月 新潟市
- 118.堤貴司、鍛冶屋浩、都築尊、根本哲臣、高橋裕、岡部幸司 咬合性外傷時の破骨細胞誘導における C-C ケモカインの役割。第 39 回福岡歯科大学学会総会、2012 年 12 月 福岡市
- 119.長岡良礼、鍛冶屋浩、府川晃久、佐々木三奈、来海慶一郎、山下善弘、大関悟、池邊哲郎、岡本富士雄、岡部幸司 窒素含有ビスホスホネート製剤 (NBP) による破骨細胞形成阻害とプレニル化促進物質による回復。第 39 回福岡歯科大学学会総会、2012 年 12 月 福岡市
- 120.堤貴司、鍛冶屋浩、高橋裕、岡部幸司 CCL2 シグナル欠損が過剰咬合力誘発性の歯槽骨吸収に及ぼす影響。第 55 回歯科基礎医学会、2012 年 9 月 郡山市
- 121.大城希美子、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、堤貴司、長岡良礼、佐々木三奈、坂上竜資、岡部幸司 窒素含有ビスホスホネート (NBPs) は破骨細胞の Clcn7 を介して Cl⁻輸送を抑制する。第 6 回トランスポーター研究会九州部会、2012 年 9 月 福岡市
- 122.鍛冶屋浩、大城希美子、岡本富士雄、岡部幸司 破骨細胞の ClC7 型 Cl⁻輸送体(Clcn7)はフェーネシル 2 リン酸合成酵素(Fdps)により活性化され、阻害剤ゾレンドロ酸はこの Cl⁻分泌能を抑制する。第 30 回日本骨代謝学会、2012 年 7 月 東京
- 123.堤貴司、鍛冶屋浩、後藤加寿子、岡部幸司 CCL2 シグナル欠損した咬合性外傷モデルマウスを用いた顎骨吸収時のケモカインの動態解析。第 30 回日本骨代謝学会、2012 年 7 月 東京
- 124.岡本富士雄、鍛冶屋浩、岡部幸司 破骨細胞から誘導される TRPM7 様陽イオン電流とその酸依存的活性化。第 8 回 TRP チャネル研究会、2012 年 6 月 岡崎市

125. Okabe K, Kajiya H, Okamoto F, Tsusumi T. Regulation of osteoclastogenesis through calcium oscillations. 第89回日本生理学会シンポジウム6、2012年3月 松本市

126. Okabe K, Okamoto F, Kajiya H, Ohgi K. Cl⁻ transporters as novel therapeutic targets for abnormal osteoclastic bone resorption. 第89回日本生理学会シンポジウム27、2012年3月 松本市

シンポジウム

第1回老化制御シンポジウム

“Oxidative Stress and Aging”

日時 2013年9月9日(月) 14:00~17:30

場所 福岡歯科大学 504教室

T. Sekiguchi (Kyushu Univ.) Elimination of oxidized nucleic acid

J-P. Cai (Beijing Institute of Geriatrics) Translational errors caused by ROS.

H. Hayakawa (FDC) Proteins that recognize oxidative RNA damage.

M. Hidaka (FDC) Molecular mechanism of the induction of apoptosis to suppress mutations and cancer.

Stuart Linn (U. C. Berkeley) The role of DDB2 (XP-E) in tumor suppression and apoptosis.

<http://www.fdcnet.ac.jp/col/facilities/cca/index.html>

各研究課題担当者の中間報告

早川 浩：酸化ストレスと遺伝子発現	p36
日高 真純：発がんを抑制するアポトーシスの機構	p41
谷口 邦久：口腔がんの頸部リンパ節転移抑制へのアプローチ	p48
梅津 桂子：クロマチンリモデリングファクターとゲノムの安定な維持	p54
池邊 哲郎：環境因子の遺伝系への作用 ～口腔粘膜の老化機構と発がんとの関係についての研究～	p60
佐藤 博信：口腔の加齢変化の個体差と骨基質の関係	p65
岡部 幸司：硬組織代謝異常とシグナル伝達	p71
沢 禎彦：腫瘍の転移と内皮細胞の応答	p82
大星 博明：脳血管障害と免疫・酸化ストレス	p88
川野 庸一：IL-10 産生性制御性 T 細胞を用いた新しい眼炎症治療戦略	p96
坂上 竜資：口腔上皮細胞の分化にともなうゲノムのエピジェネティックな変化	p102
廣藤 卓雄：プロバイオティクスと口腔疾患	p108
米田 雅裕：加齢に伴う口腔環境の変化および口腔環境の改善	p121
井口 八郎：酸化ヌクレオチドと遺伝情報発現異常	p130

研究課題	酸化ストレスと遺伝子発現
研究代表者	早川 浩（機能生物化学講座・生化学分野・教授）

要約

我々は本研究で酸化 RNA に特異的に結合するタンパク質 **Auf1/HNRNPD** について以下の点を明らかにした。

- ① 細胞粗抽出液中の **Auf1** タンパク質は 8 オキソグアニンを特異的に結合する
- ② 精製された組み換えタンパク質はそれ自体のみでは酸化 RNA 特異的に結合しないが、細胞抽出液をこの精製タンパク質に加えると酸化 RNA 特異的結合能が回復する。このことから **Auf1** タンパク質はそれ以外のタンパク質と複合体を形成するなどして特異的結合能を獲得しているものと考えられる。

研究目的

酸素は生命活動に不可欠であるが、一方で生体成分を酸化し悪影響を及ぼす。中でも DNA や RNA の酸化は発がんや老化を引き起こす原因になると考えられる。それに対し生体はこれらの酸化を防ぐ装置を持っている。

酸化ストレスにより核酸は酸化され様々な酸化修飾塩基が生じるが、その中で最も重要なのはグアニン塩基の酸化体である 8 オキソグアニン (**8oxoG**) の形成である。8 オキソグアニンはシトシンのみならずアデニンとも塩基対合が出来るため遺伝情報の伝達過程でエラーを引き起こす。DNA 上に生じた場合には突然変異を、さらには発がんを引き起こすことが知られ、研究がよく進められている。一方、RNA の場合には誤転写・誤翻訳を通じて異常タンパクの合成を引き起こすことを我々ははじめて報告したが、最近この 8 オキソグアニンを含む RNA と老化との関連が注目されている。即ち、アルツハイマー患者や老化マウスの脳神経細胞で 8 オキソグアニンを含む RNA が蓄積しているという事実である。8 オキソグアニンを含む RNA は異常タンパクの合成を起こすが、これらの疾患でも異常タンパクの出現が特徴的である。また、酸化された RNA は分解され、尿中などに 8 オキソグアニンを含むヌクレオシド、8 オキソグアノシンとして排泄されると考えられるので老化の指標として期待できる。

我々は特に RNA の酸化に注目して研究を進めているが、これまでの研究から RNA の酸化障害を防ぐ機構としては下記の図 1 に示すような 2 つの仕組みが考えられる。

- 1) RNA 合成の前駆体となる酸化ヌクレオチド(**8oxoGTP**, **8oxoGDP**)の分解。
- 2) RNA ポリメラーゼが **8oxoGTP** を基質として 8 オキソグアニンを RNA 中に取り込んだり、RNA の直接酸化によって生じた **8oxoG** を含む RNA に対する排除系。

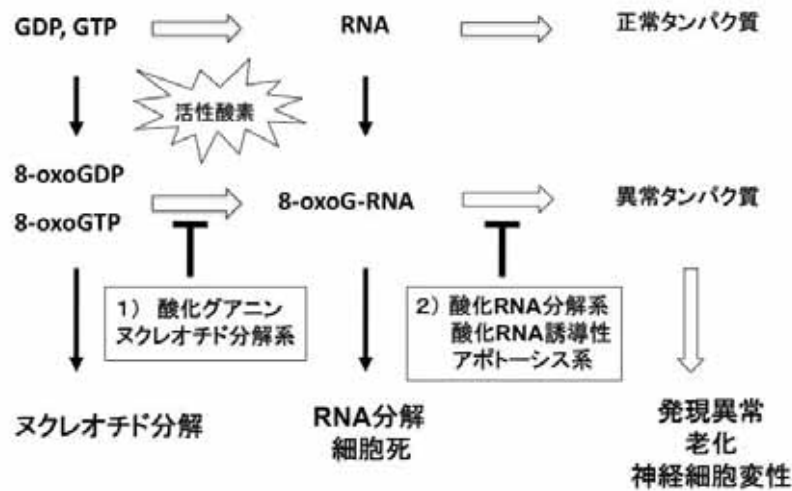


図1 酸化RNA排除機構のモデル

本研究においては上に挙げた1)、2)に関わる因子を同定・解析し、哺乳動物における酸化ストレス下の遺伝子発現の品質管理機構の全貌を明らかにすることを目的とする。

方法

酸化RNAを特異的に認識するタンパク質として既にAuf1タンパクを同定したが、このタンパクの詳細な生化学的解析を進める為に新規プローブを作成した。これまでのプローブが一部酵素を利用し、RNAとビーズ間がpolyA:polyTのアニーリングにより結合したものであるに対し、今回は全て化学合成によるもので①収率が極めて優れている。②共有結合でRNAをビーズに結合させることからプローブ自身が安定。③さらに合成オリゴヌクレオチドへの応用も可能など様々な利点がある。

結果と考察

1) 酸化ヌクレオチド分解系

GMPをGDPにリン酸化する酵素である大腸菌のGuanylate kinaseは酸化型のGMPを識別し、8oxoGMPを8oxoGDPにリン酸化しないことを確認した。一方nucleoside diphosphate kinaseやadenylate kinaseは8oxoGDPをリン酸化して8oxoGTPを生産する、このことからGuanylate kinaseがゲイトキーパーとして働いていることが明らかとなった(論文1)。

2) Auf1 タンパクの解析

細胞液中の Auf1 タンパクは 8 オキソグアニンを含む RNA に特異的に結合する

8 オキソグアニンを含むオリゴマーを化学合成し、これ「方法」で述べた作成法を用いてアガロースビーズに共有結合させた。コントロールとしては同一配列をもち 8 オキソグアニンの代わりに通常のグアニンを含むオリゴマーを用いた。まずこの新規プローブがデザイン通りに完成しているかどうかについて 8 オキソグアニン特異的抗体を用いて検証した。図 2 の A に示すように特異抗体は 8 オキソグアニンを含むオリゴマープローブのみに結合し、コントロールプローブには全く結合しないことからデザイン通りのプローブが完成した。

次にこのプローブを用い酸化 RNA 結合タンパクとして同定した Auf1 タンパクが特異的に結合するかどうかを調べた。図 2 の B に示されるように Auf1 タンパクは 8 オキソグアニンを含むオリゴマーを共有結合させたアガロースビーズのみに結合し、コントロールのオリゴマービーズには結合しなかった。このことから細胞液中の Auf1 タンパクは 8 オキソグアニンを含む RNA に特異的に結合することが明らかとなった。なお Auf1 タンパクにはスプライシングにより 4 つのバリエーションがあることが知られているが、HeLa 細胞で検出される 3 個全てが 8 オキソグアニンを含むオリゴマーに特異的に結合する。

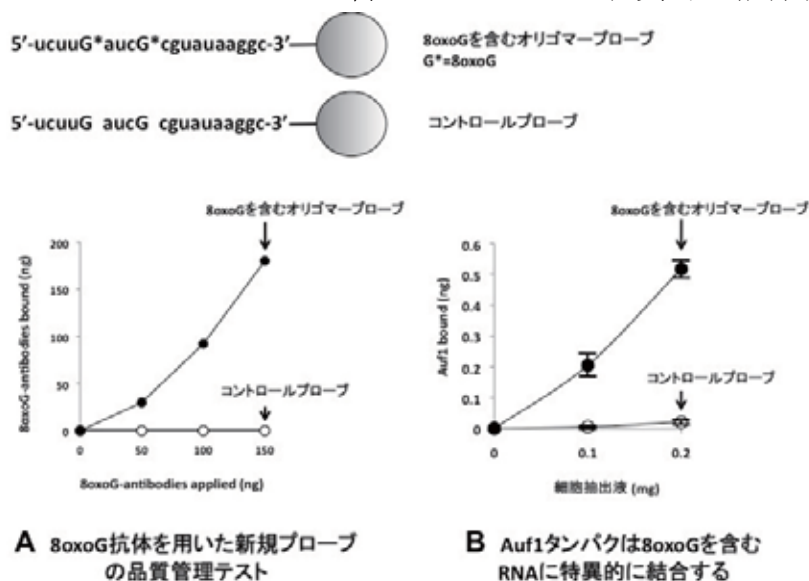


図2 Auf1タンパク質は8oxoGを含むRNAに特異的に結合する

精製された組換え Auf1 タンパクはそれ自身だけでは酸化 RNA に特異的に結合出来ず細胞性因子の助けが必要

4 つのスプライシングバリエーションを大腸菌で組換えタンパクとして大量生産させ精製した。これらの精製 Auf1 タンパクはそれ自身のみでは酸化 RNA 特異的な結合能を示さないが、これに細胞抽出液を混ぜると特異的結合能が回復することが判った (図 3)。

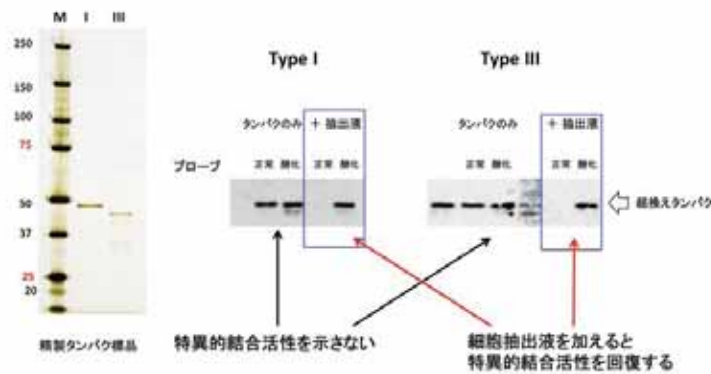


図3 精製された His-Tagged Auf1 タンパクを用いた結合活性の検討

このことから、Auf1 タンパクは未知の細胞性因子と複合体を形成するか、あるいは未知の細胞性因子により修飾を受けて、酸化 RNA 特異的な結合能を獲得することが考えられる。現在の作業仮説として、この酸化 RNA への結合により酸化 RNA の分解、あるいは、酸化 RNA の蓄積した細胞の Apoptosis が誘導されるのではないかと考え (図 4)、この未知の因子の同定を進めている。

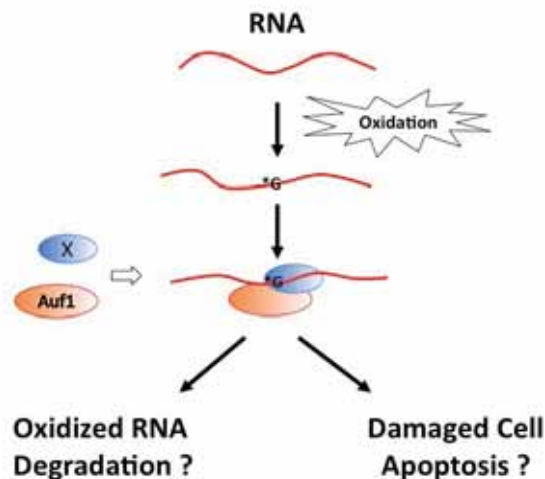


図 4

医学などの応用面については、老化モデルマウスやヒトのアルツハイマー患者由来の組織を用いた病理学的解析について成果が上がってきた。(論文 2、4) また、老化したマウスやサル (*Macaca mulatta*) の尿中に酸化 RNA の分解産物と考えられる 8 オキシグアノシンが増加していることが質量分析の結果明らかになった。この増加は老化モデルマウスである SAMP8 で上昇している。このことから尿中の 8 オキシグアノシンは老化の有効なマーカーとして今後期待できる。(論文 3、5)

発表論文

1. Elimination and Utilization of Oxidized Guanine Nucleotides in the Synthesis of

- RNA and its Precursors. Sekiguchi T, Ito R, Hayakawa H, Sekiguchi M. *J. Biol. Chem.* 査読有、288, 8128-35 (2013)
2. Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues. Nie, B., Gan, W., Shi, F., Hu, GX., Chen, LG., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., Cai, JP. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 査読有、ID 303181, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/303181> (2013)
 3. Oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in leukocytes, plasma and urine of *Macaca mulatta*: 8-oxoguanosine in urine is a useful marker for aging. Shi, F., Nie, B., Gan, W., Zhou, XY., Takagi, Y., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., Cai, JP. *Free Radic Res.* 査読有、46, 1093-98 (2012)
 4. Greater nucleic acids oxidation in the temporal lobe than the frontal lobe in SAMP8. Shi F, Gan, W., Nie, B., Takagi, Y., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., Cai, JP. *Neuroreport.* 査読有、23, 508-512 (2012)
 5. Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging. Gan, W., Nie, B., Shi, F., Xu, X., Jianchang Qian, J., Takagi, Y., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., Cai, JP. *Free Radical Biology & Medicine* 査読有、52, 1700-1707 (2012)
 6. Lowered Nudix type 5 (NUDT5) expression leads to cell cycle retardation in HeLa cells. Zhang, LQ., Dai, DP., Gan, W., Takagi, Y., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., Cai, JP. *Mol. Cell. Biochem.* 査読有、363, 377-384 (2012)

学会発表

1. Proteins that recognize oxidative RNA damage. Hiroshi Hayakawa.
第86回日本生化学会大会、インターナショナルシンポジウム: Gene Expression under Oxidative Stress 03-1IS15a 横浜、2013年、9月

研究課題	発がんを抑えるアポトーシスの機構
研究代表者	日高真純（細胞分子生物学講座・分子機能制御学分野・教授）

要約

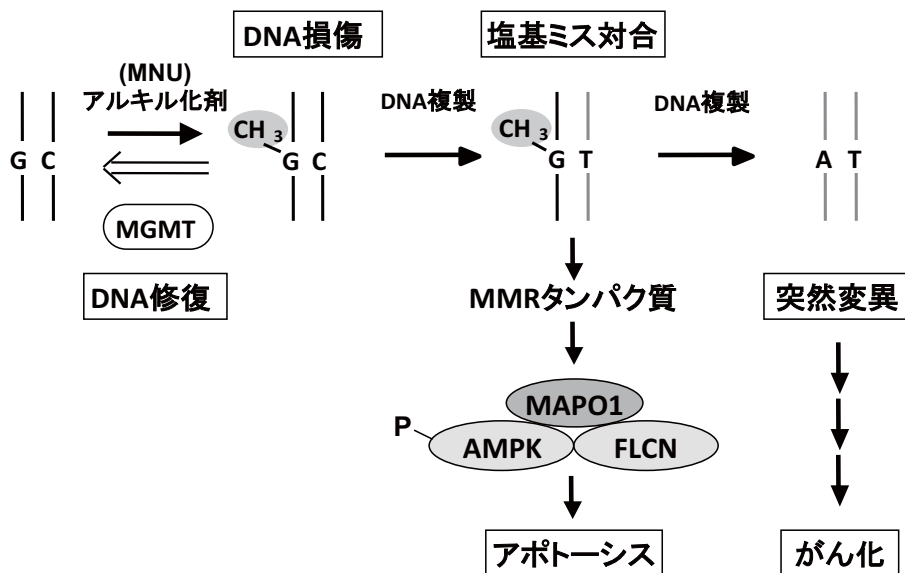
DNA上に生じた修飾塩基 O⁶-メチルグアニンはDNA複製過程で塩基の誤対合を形成し、突然変異さらには発がんをひき起こす原因となる。しかし、高等生物はこの損傷を持つ細胞にアポトーシスを誘導し個体から排除することで変異細胞の出現を抑制している。我々はジーントラップ法を用いて、このアポトーシス誘導に関わる新規因子として MAPO1 を同定した。MAPO1 は細胞質に局在し、発がん抑制因子の一つである FLCN と細胞内のエネルギー感知キナーゼである AMPK と相互作用する。siRNA を用いた *Ampka* あるいは *Fln* 遺伝子ノックダウン細胞では、アルキル化剤処理後のサブ G₁ 細胞の出現が顕著に抑制されたことから、AMPK と FLCN も MAPO1 同様にアポトーシス誘導に必要であることが示された。また、AMPK-MAPO1-FLCN 複合体のアポトーシス誘導過程での動態を免疫沈降法およびイムノブロット法により解析したところ、AMPK α はアポトーシス誘導後に MAPO1-FLCN 複合体から解離し、それに伴い MAPO1 がタンパク質レベルで安定化することが明らかになった。MG132 を用いた実験により、MAPO1 タンパク質の安定性にはプロテアソームに依存したタンパク分解系が深く関わっており、その分解を受けずに安定化することで、MAPO1 はアポトーシス誘導能を活性化する機構が示唆された。

研究目的

環境中の酸素や化学物質は生命活動にとって不可欠なものであるが、そこから生じる活性酸素や変異原物質はゲノム DNA を傷つけ、がんや老化をひき起こす原因となる。DNA 損傷のひとつである修飾塩基 O⁶-メチルグアニンは、DNA 複製過程で塩基ミス対合を形成し突然変異の原因となるとともに、細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。このアポトーシス誘導にはミスマッチ修復（以下 MMR と略記）タンパク質が必要であるが（Hidaka *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 33, 5703-5712, 2005）、MMR タンパク質を欠損した細胞においては突然変異の蓄積が起こること、また、MMR 遺伝子が不活化されたノックアウトマウスでは発がん頻度の上昇が起こることから、この機構の解明は突然変異と発がんの抑制機構の解明に繋がると考えられる（図1）。そこで我々は、本アポトーシスの活性化機構の解明を目的として、アポトーシス誘導の初期反応を生化学的に解析し、ヒト細胞のクロマチン上において MMR タンパク質が複合体を形成して O⁶-メチルグアニンを含む DNA 損傷を認識していることを明らかにした。それと同時に、MMR タンパク質が Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) との相互作用を通して DNA 複製反応中に

DNA 損傷を認識していることも示した。その後、DNA 損傷の認識後に機能する新規アポトーシス誘導因子の網羅的な同定を目指し、遺伝学的スクリーニングを行ってきた。本研究は、生化学的ならびに遺伝学的解析によりアポトーシス誘導因子を新規に同定し、細胞死誘導経路の分子機序を明らかにすることを目的とする。

図1. アポトーシス誘導による突然変異ならびに発がんの抑制機構



方法

遺伝学的解析における宿主細胞には O⁶-メチルグアニンを特異的に修復する酵素 MGMT を欠損した細胞を用いた。この細胞はアルキル化剤に対して高い感受性を示すが、MMR タンパク質のようにアポトーシス誘導で機能するタンパク質を同時に欠損した細胞は、アポトーシスを誘導できなくなりアルキル化剤に対して抵抗性を獲得する。我々は、この表現系をアポトーシス誘導欠損細胞のスクリーニング法に利用した (図2)。まず、プロモーター領域を欠いたハイグロマイシン耐性遺伝子をもつレトロウイルスベクターを用いた遺伝子トラップ法により、アルキル化剤 N-メチル-N-ニトロソウレア (MNU) に対し感受性である *Mgmt* 欠損細胞に由来する遺伝子破壊株ライブラリー (ハイグロマイシン耐性) を構築する。次に、その中からアルキル化剤 MNU に抵抗性を示す変異細胞株を単離する。これらの細胞株はアポトーシス誘導遺伝子が破壊されている可能性が高く、破壊された遺伝子は薬剤耐性遺伝子の DNA 配列情報を手がかりとした PCR 法にて容易に同定できる。

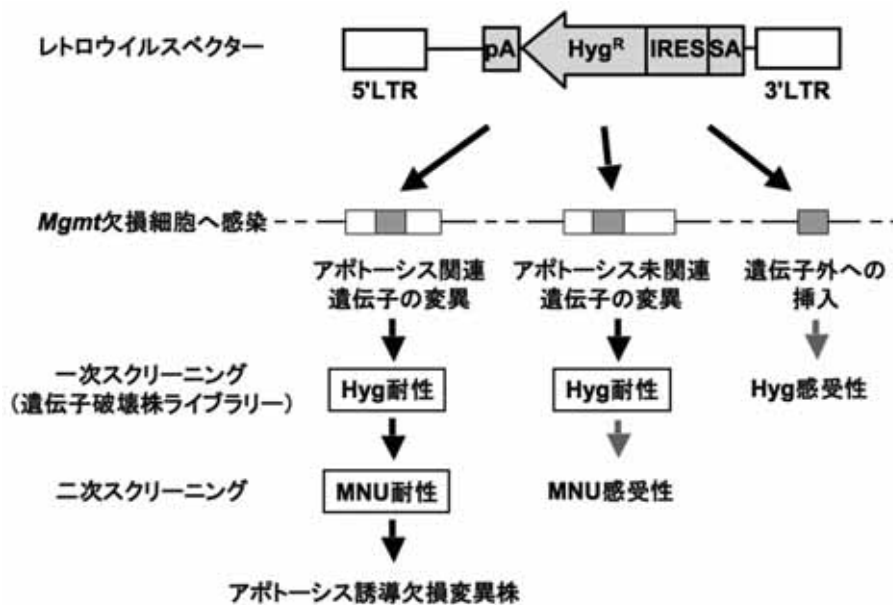


図2、ジーントラップ法によるアポトーシス誘導欠損細胞のスクリーニング法

結果

1. アポトーシス誘導過程での MAPO1 タンパク質の安定化

我々は、図2に示した遺伝学的スクリーニングにより新規アポトーシス誘導因子 MAPO1 (*O*⁶-methylguanine-induced apoptosis 1)を同定した (Komori *et al.*, *Oncogene*, 28, 1142-1150, 2009)。MAPO1 は細胞質に局在し、FLCN (Folliculin) と AMPK (AMP-activated protein kinase)と相互作用する。FLCNはBHD (Birt-Hogg-Dube) 症候群 (皮膚、肺、腎臓等の臓器で高頻度に腫瘍を生じる) の原因因子であり、AMPKは細胞の増殖制御において重要な機能を担うリン酸化酵素である。siRNAを用いた *Ampkα*あるいは *Flcn* 遺伝子ノックダウン細胞では、アルキル化剤処理後のサブ G₁細胞の出現が顕著に抑制されたことから、AMPKとFLCNもMAPO1同様にアポトーシス誘導に必要であることが示された (Lim *et al.*, *DNA Repair*, 11, 259-266, 2012)。

アポトーシス誘導過程でのMAPO1の発現レベルをイムノブロット法により解析したところ、MAPO1タンパク質は細胞のアルキル化剤 (MNU) 処理後に経時的に上昇し、72時間後には未処理時に比べて約2.1倍に増加することが分かった (図3A)。このタンパク質レベルの変動の調節のしくみを調べるために、FLAG-MAPO1を安定に発現する細胞のプロテアソーム阻害剤MG132による処理を行った。図3Bに示すように、MAPO1のタンパク質レベルはMG132処理6時間後と12時間後に有意に増加した。同様な増加は、ユビキチン/プロテアソームに依存して恒常的に分解されていることが知られているp53タンパク質においても観察された。これに対して、FLCNとAMPKαのタンパク質レベル

は MG132 処理後も変動しなかった。この結果は、MAPO1 はプロテアソーム依存的に定常的に分解されているが、アポトーシス誘導時には安定化されることを示唆している (Sano *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 430, 810-815, 2013)。

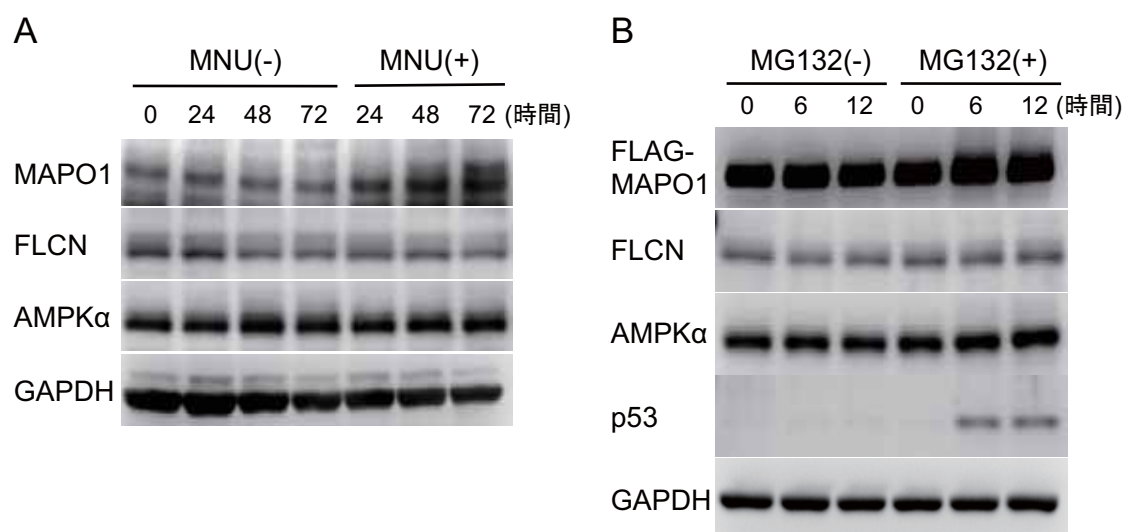


図3、アポトーシス誘導過程における MAPO1 の安定化

2. FLCN と AMPK の MAPO1 タンパク質安定化への影響

MAPO1 は FLCN と AMPK と相互作用することが分かっているので、これらの相互作用因子は MAPO1 の安定化に関与することが考えられる。そこで、これらの遺伝子に特異的な siRNA を細胞内へ導入し、*FLCN* ならびに *AMPKα* 遺伝子発現抑制時の MAPO1 のタンパク質レベルをイムノブロット法により解析した (図4)。コントロールの siRNA を導入した細胞 (siCONT) の定常時の MAPO1 レベルを 1 とすると、MNU 処理 72 時間後にそのレベルは図 3 A の結果と同じく約 2 倍に上昇した。*FLCN* ノックダウン細胞 (siFLCN) では、MNU 未処理時の MAPO1 レベルがコントロールと比べて約 41% に減少し ($*P<0.01$)、MNU 処理後もその増加はほとんど観察されなかった。それに対して、*AMPKα* ノックダウン細胞 (siAMPKα) では、MNU 未処理時においてもコントロールレベルの約 2 倍に増加し ($*P<0.01$)、MNU 処理後のレベルはさらに上昇した。これらの結果は、*FLCN* は MAPO1 の安定化に関してポジティブに、*AMPK* は逆にネガティブに関与していることを示唆している。

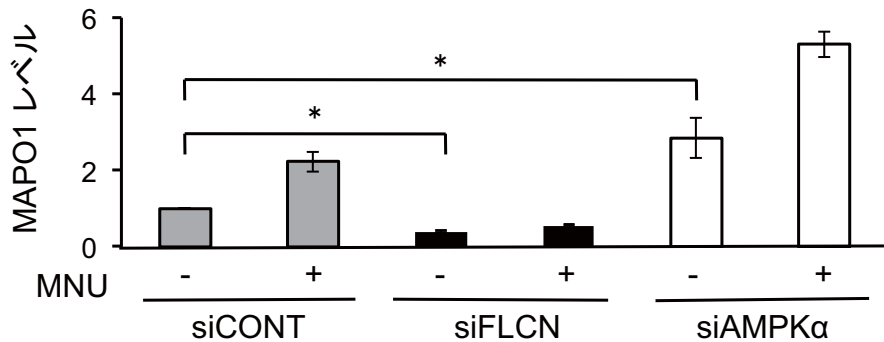


図4、MAPO1 レベルへの FLCN-と MPK α -ノックダウンの影響

3. アポトーシス誘導過程での AMPK-MAPO1-FLCN 複合体の変動

アポトーシス誘導過程における MAPO1 の FLCN と AMPK との物理的な相互作用の変動を解析するために、FLAG-MAPO1 を安定に発現する細胞を MNU 処理し、その後 72 時間までの細胞抽出液 (Input) を用いて抗 FLAG 抗体ビーズによる免疫沈降実験を行った。図 5 に示すように、今までの報告通り MNU 未処理の条件 (0 時間) では MAPO1 は FLCN と AMPK α の両者と有意な相互作用を形成した。MNU 処理後も MAPO1 と FLCN の安定な相互作用は保たれたが、AMPK α は MAPO1 からゆっくりと解離し、72 時間後にはその相互作用は著しく低下することが見出された。AMPK の MAPO1 からの解離がアポトーシス誘導の活性化と密接に関連している可能性が考えられる。

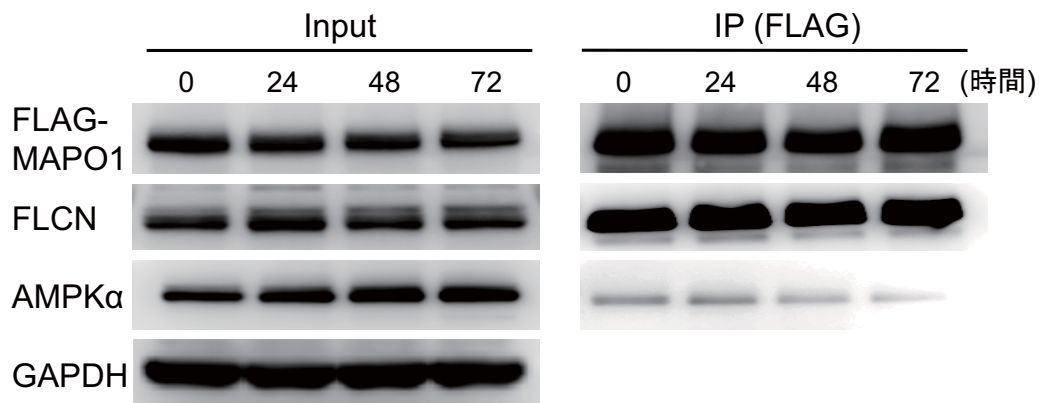


図5、アポトーシス誘導過程における MAPO1 の FLCN と AMPK α との相互作用の変動

考察

我々はレトロウイルスベクターを用いたジーントラップ法により新規のアポトーシス誘導因子 MAPO1 を同定した。この因子は今まで全く解析されずにきたタンパク質であるが、興味深いことにこのタンパク質は生物種を通して高度に保存されており、その機能の生物

学的重要性が伺える。本研究において、細胞内の MAPO1 は定常状態では低レベルに抑えられているが、アポトーシス誘導に伴い増加することが明らかとなった。このタンパク質レベルの変動は MAPO1 の相互作用因子である AMPK と FLCN により調節されており、AMPK は MAPO1 のプロテアソーム依存的な分解、そして FLCN はその安定化を促進している可能性が示唆された。そして、プロテアソーム依存的な分解システムを逃れて安定化した MAPO1-FLCN 複合体がアポトーシス誘導のシグナル伝達において重要な機能を担っていると示唆される。今後は、MAPO1 タンパク質複合体の変動に関連したアポトーシス誘導活性の制御機構を分子レベルで明らかにしていきたいと考えている。

発表論文

1. Stabilization of MAPO1 by specific binding with folliculin and AMP-activated protein kinase in O⁶-methylguanine-induced apoptosis. Sano S., Sakagami R., Sekiguchi M., Hidaka M. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有、430, 2, 810-815 (2013)
2. The identification of a novel gene, MAPO2, that is involved in the induction of apoptosis triggered by O⁶-methylguanine. Fujikane R, Sanada M, Sekiguchi M, Hidaka M. *PLoS ONE*, 査読有、7, 9, e44817 (2012)
3. Activation of AMP-activated protein kinase by MAPO1 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA. Lim TH., Fujikane R., Sano S., Sakagami R., Nakatsu Y., Tsuzuki T., Sekiguchi M., Hidaka M. *DNA Repair*, 査読有、11, 259-266 (2012)
4. A novel protein, MAPO1, that functions in apoptosis triggered by O⁶-methyl guanine mispair in DNA. Komori, K., Takagi, Y., Sanada, M., Lim, TH., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M., Hidaka, M. *Oncogene*, 査読有、28, 1142-1150 (2009)

総説

1. 変異細胞を排除するアポトーシスの誘導機構. 日高真純. 放射線生物研究、査読有、49, 1, 73-84 (2014)

学会発表

1. アポトーシス誘導過程の MAPO1 の安定化は FLCN と AMPK により制御される. 且

高真純、佐野しおり、坂上竜資、関口睦夫. 第 85 回大会日本遺伝学会、慶応義塾大学、2013 年 9 月.

2. アポトーシス誘導過程における MAP01 タンパク質の安定化. 佐野しおり、坂上竜資、関口睦夫、且高真純. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月.
3. 発がんを抑制するアポトーシスの誘導機構. 且高真純、佐野しおり、藤兼亮輔、林徳豪、坂上竜資、中津可道、續輝久、関口睦夫. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月.
4. The identification of a novel gene, MAPO2, that is involved in the induction of apoptosis triggered by O⁶-methylguanine. Fujikane R., Sanada M., Sekiguchi M., Hidaka M. The 8th 3R Symposium, Awaji, Japan, November 2012.
5. MAPO1 と FLCN による AMPK の活性化はアポトーシスを誘導する. 且高真純、林徳豪、藤兼亮輔、佐野しおり、坂上竜資、中津可道、續輝久、関口睦夫. 第 84 回大会日本遺伝学会、九州大学、2012 年 9 月.
6. MAPO1/FLCN/AMPK protein complex is involved in apoptosis induced by DNA damage. Hidaka M., Fujikane R., Sano S., Sakagami R., Sekiguchi M. Birt-Hogg-Dube Syndrome 3rd International Symposium 2011. Maastricht, Netherland, May 2011.

研究課題	口腔がんの頸部リンパ節転移抑制へのアプローチ
研究代表者	谷口 邦久（生体構造学講座・病態構造学分野・教授）

要約

本研究では、(1) cancer-initiating cells (CICs) のマーカーである aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1) の口腔扁平上皮癌組織での分布様式が、臨床的再発と関連することを臨床病理学的検索により示した。(2) また、口腔扁平上皮癌細胞を用いた *in vitro* 実験から、シスプラチン抵抗性癌細胞では、ALDH1 陽性細胞の増加が明らかとなった。(3) シスプラチン抵抗性 ALDH1 陽性細胞の性状を検索した結果、同細胞は①抗癌剤排出機構に関与する ABCG2 発現の上昇、②浸潤能の亢進および③自己複製能の亢進が認められた。以上の結果から、ALDH1 陽性口腔扁平上皮癌細胞は、CICs としての性状をもつことが示唆された。さらに、臨床的に同細胞の存在あるいは残存は、再発に関連することが推測された。

研究目的

口腔がん（主に口腔扁平上皮癌）の所属リンパ節（頸部リンパ節）転移の有無は、患者の予後に影響する重要な因子である。したがって、がん細胞の転移抑制機序の解明はがん治療効果の向上に直結する課題である。がん組織は多様な分化段階のがん細胞群から構成される *heterogenous* な集団であることが明らかとなってきた。近年、これらのがん細胞集団の中には、がん幹細胞（cancer stem cell, CSC）あるいは cancer initiating cell (CIC) が少数ながら含有していることが報告されている。CIC は、幹細胞の特徴である自己複製能および多分化機能を有しがん細胞の増殖および浸潤に重要な細胞である。さらに、CIC は低酸素、低栄養状態での生存あるいは治療抵抗性の機能を保持していることが推測されている。

Aldehyde dehydrogenase (ALDH) のアイソフォームである ALDH1 活性は、血液および神経幹細胞での上昇が報告され、その後、多くの悪性腫瘍組織（多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、脳腫瘍、肺癌、乳癌、膵臓癌および口腔癌）に含有されている幹細胞においても高い活性を示すことがわかった。すなわち、ALDH1 は、正常およびがんにおける幹細胞のマーカーとしての可能性が推測されている。さらに、ある種の悪性腫瘍においては、ALDH1 発現と臨床的予後との相関性も報告されている。

したがって、ALDH1 発現は口腔扁平上皮癌の生物学的性状に関与することが推測される。さらに、ALDH1 発現癌細胞は、CIC として治療抵抗性にも関連しているのではないかと考えた。そこで、本研究では、1) 口腔扁平上皮癌組織での ALDH1 発現を臨床病理学的に検索し、2) *in vitro* 実験において、抗癌剤であるシスプラチン抵抗性扁平上皮癌

細胞での ALDH1 発現および発現細胞の CIC としての機能を検討した。

研究組織

大野 純 (病態構造学分野・講師)

太田信敬 (口腔腫瘍学分野・大学院生、現・助教)

瀬野恵衣 (総合歯科学分野・大学院)

方法

まず始めに、90 症例の口腔扁平上皮癌 (OSCC) 組織での ALDH1 発現を免疫組織化学的に検索し、臨床態度との相関性を検討した。次に、ヒト口腔扁平上皮癌細胞(HSC-3)を用いて、シスプラチン刺激群と非刺激群 HSC-3 細胞での細胞増殖アッセイ、ALDH1 発現および CIC 機能に関する各種アッセイを行った。

結果と考察

1. OSCC 組織での ALDH1 発現は再発と相関する

90 症例 OSCC 組織での免疫組織化学的な ALDH1 発現様式は、陰性、限局性 (<20%染色率) とび漫性 (>20%染色率) の 3 グループに分けた (図 1)。

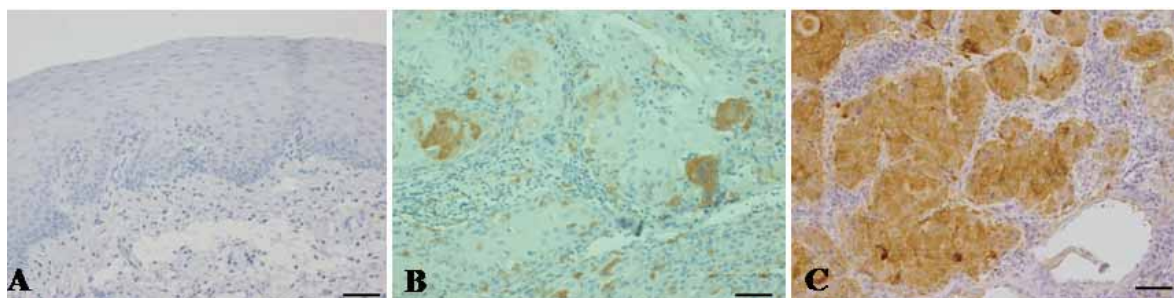


図 1 OSCC 組織における ALDH1 染色様式。(A) 非癌部口腔粘膜では陽性細胞はみられない。(B)OSCC 組織での限局性 ALDH1 発現。(C)OSCC 組織でのび漫性 ALDH1 発現。

ALDH1 陽性率については、陰性 (7 例、7.8%; score 0) ; 1-5% (20 症例、22.8%; score 0) ; 6-20% (16 症例、17.8%; score 1) ; 21-50% (37 症例、41.1%; score 2) ; >50% (10 症例、11.1%; score 3) であった。ALDH1 高発現群 (>20%) と、年齢 ($p=0.464$)、性別 ($p=0.876$)、発生部位 ($p=0.392$)、腫瘍の大きさ ($p=0.239$)、T 分類 ($p=0.574$)、リンパ節転移 ($p=0.577$)、pTNM スコア ($p=0.694$) には相関性を認めなかった。しかしながら、ALDH1 高発現群 (>20%) と局所再発 ($p=0.006$) には、正の相関性を認めた。

2. OSCC 細胞での ALDH1 発現

OSCC 細胞での ALDH1 発現は、免疫細胞化学的および酵素組織化学的に検索を行った。免疫組織化学的および酵素組織化学的に、ALDH1 は HSC-3 細胞群に少数ながら、存在し

た。フローサイトメーター検索において、ALDH1 発現細胞は 0.62 %であった。

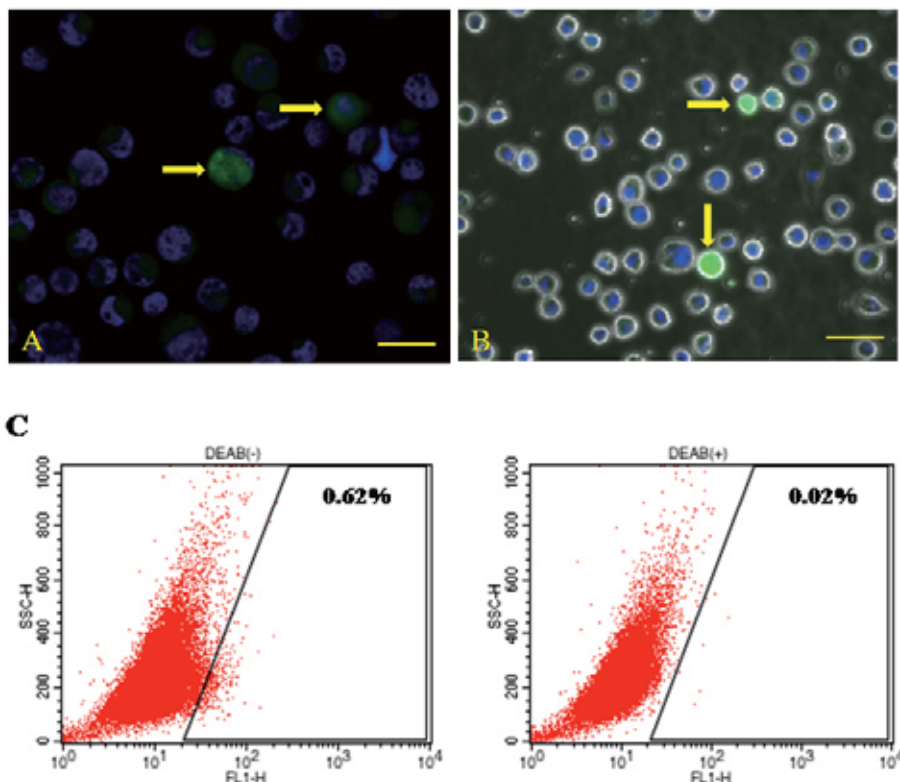


図2 HSC-3細胞でのALDH1発現細胞。(A)免疫組織化学的検索。(B)酵素組織化学的検索。(C)フローサイトメーターでの陽性細胞分布。ALDH1活性は阻害剤であるDEABにより消失した。

3. OSCC細胞でのALDH1発現に対するシスプラチンの影響

一般的に抗癌剤として使用されているシスプラチンに対するALDH1陽性細胞の抵抗性について検討した。まず、シスプラチン投与におけるOSCC細胞の増殖活性をCCK-8 assayにより検索した。0.1および1 μ Mシスプラチンでは、細胞増殖に影響を与えなかった。しかしながら、5 μ M以上の濃度では細胞増殖の減少を認めた。シスプラチン抵抗性OSCC細胞(CiSCs)でのALDH1陽性細胞をフローサイトメーターにより検索すると、1 μ Mでは1.81%、5 μ Mで7.70%に対して、10 μ Mでは14.8%と上昇した。この結果は、シスプラチン非投与(コントロール)と比較すると、24倍も上昇していた。すなわち、シスプラチン抵抗性OSCC細胞群では、ALDH1陽性細胞が増加していることを示している。

これらのCiSCsでは、シスプラチン排泄ポンプに関与するABCG2発現が亢進していることがwestern blotting法により明らかとなった。この結果は、CiSCs細胞群は抗癌剤排出機能を有している可能性を示唆している。

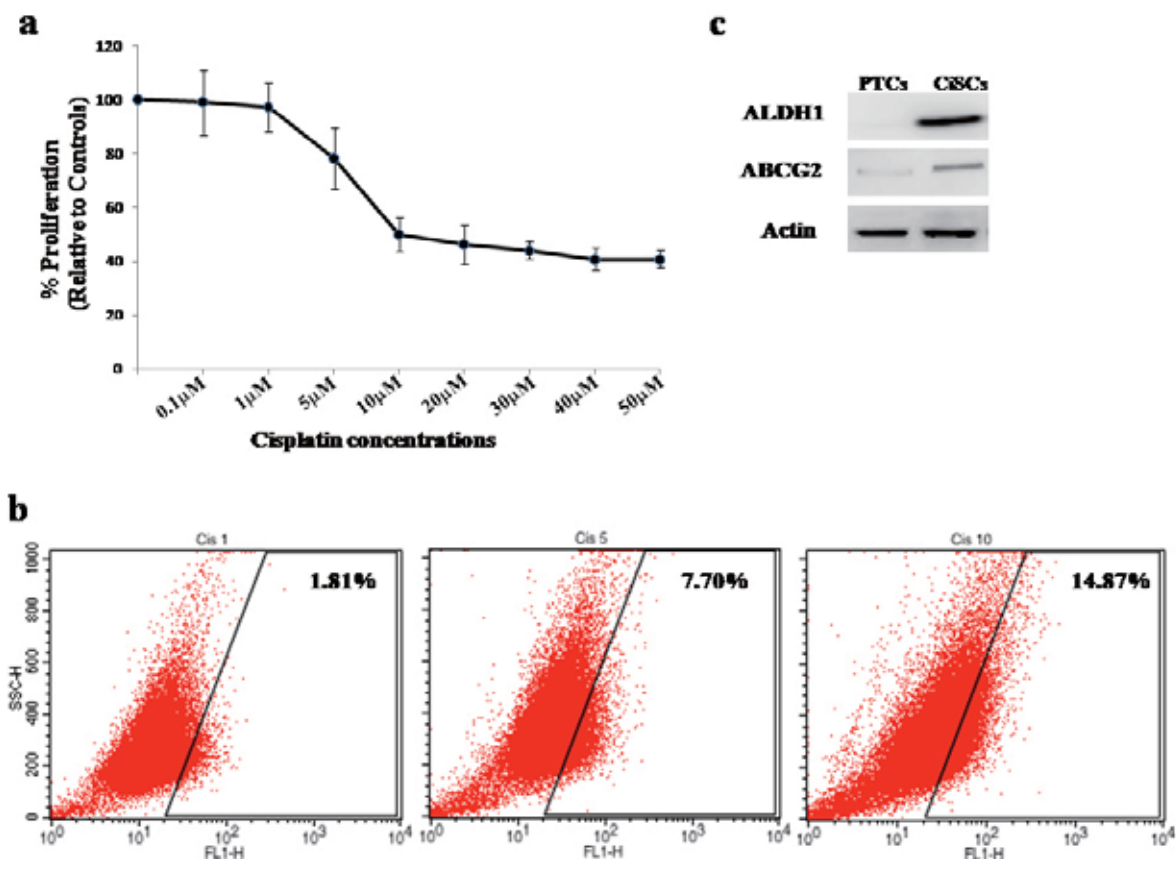


図3 HSC-3細胞へのシスプラチンの影響。(A) CCK-8法による細胞増殖能。(B) シスプラチン投与濃度によるALDH1陽性細胞percentage。(C) Western blotting法でのABCG2発現。PTCs,シスプラチン非投与(コントロール群);CiSCs,シスプラチン10 μM投与群。

4. CiSCsの浸潤能

CiSCsとPTCsでのALDH1陽性細胞密度の違いがフローサイトメーター検索で明らかとなったので、次に両者の浸潤能について検討した。方法は、Matrigel invasion assayを応用した。浸潤細胞数は、CiSCsが 134 ± 12.1 に対して、PTCsでは 54 ± 23.4 とCiSCs群が有意に高い値を示した。この結果は、シスプラチン抵抗性癌細胞は高い浸潤性を保持していることが明らかとなった。

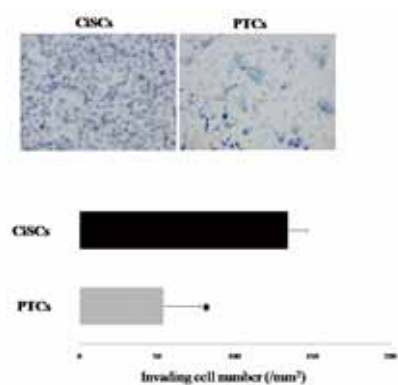


図4 CiSCsおよびPTCsにおけるMatrigel invasion assay。

5. CiSCs での cancer sphere formation

癌幹細胞の特徴の一つに、自己複製能を保持していることが知られている。CiSCs での自己複製能を検討するために、無血清下での cancer sphere formation assay を行った。PTCs と比較して、CiSCs では大きな sphere 形成が認められた。すなわち、CiSC を構成する細胞群は、癌幹細胞が PTCs 群よりも多く含有されていることが示唆された。

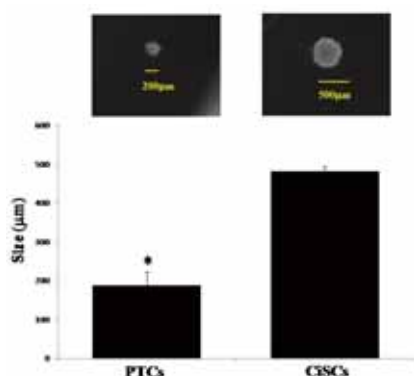


図5 CiSCs および PTCs での cancer sphere formation assay。

以上の結果から、ALDH1 発現扁平上皮癌細胞が局所再発に関与することが明らかとなった。培養細胞実験から、ALDH1 活性を有する癌細胞群は、抗癌剤抵抗性、浸潤能の亢進および自己複製能などの CIC としての性状を強く示すことが明らかとなった。

発表論文

1. Dynamic changes in cell-surface expression of mannose in the oral epithelium during the development of graft-versus-host disease of the oral mucosa in rats. Hanada H, Ohno J, Seno K, Ota N, Taniguchi K. *BMC Oral Health* 査読有、15, 5 (2014).
2. In vitro and in vivo expression of aldehyde dehydrogenase 1 in oral squamous cell carcinoma. Ota N, Ohno J, Seno K, Taniguchi K, Ozeki S. *Int J Oncol*. 査読有、44, 435-442 (2014).
3. Lupus-like oral mucosal lesions in mercury-induced autoimmune response in Brown Norway rats. Seno K, Ohno J, Ota N, Hirofuji T, Taniguchi K. *BMC Immunol*. 査読有、14, 47 (2013).
4. Tumor-induced lymphangiogenesis in cervical lymph nodes in oral melanoma-bearing mice. Ozasa R, Ohno J, Iwahashi T, Taniguchi K. *J Exp Clin Cancer Res* 査読有、31, 83 (2012).

学会発表

1. オートファジー抑制による口腔扁平上皮癌の **cancer sphere** 形成能の変化. 瀬野恵衣、大野純、廣藤卓雄、谷口邦久. 第 103 回日本病理学会、広島、2014 年 4 月.
2. T 細胞免疫応答型口腔粘膜病変におけるエフェクター細胞の上皮親和性機構. 大野純、瀬野恵衣、谷口邦久. 第 103 回日本病理学会、広島、2014 年 4 月.
3. オートファジー制御による **cancer sphere** 形成能. 瀬野恵衣、大野純、太田信敬、廣藤卓雄、谷口邦久. 第 24 回日本臨床口腔病理学会、東京、2013 年 8 月.
4. オートファジー制御による口腔扁平上皮癌細胞の動態. 大野純、瀬野恵衣、太田信敬、谷口邦久. 第 102 回日本病理学会、札幌、2013 年 6 月.
5. エナメル上皮癌と癌腫に類似像を含有するエナメル上皮腫の 2 例. 太田信敬、大野純、瀬野恵衣、谷口邦久. 第 102 回日本病理学会、札幌、2013 年 6 月.
6. ConA による口腔扁平上皮癌細胞へのオートファジー誘導. 大野純、岩橋輝明、谷口邦久. 第 101 回日本病理学会、東京、2012 年 4 月.

研究課題	クロマチンリモデリングファクターとゲノムの安定な維持
研究代表者	梅津 桂子 (機能生物化学講座・生化学分野・教授)

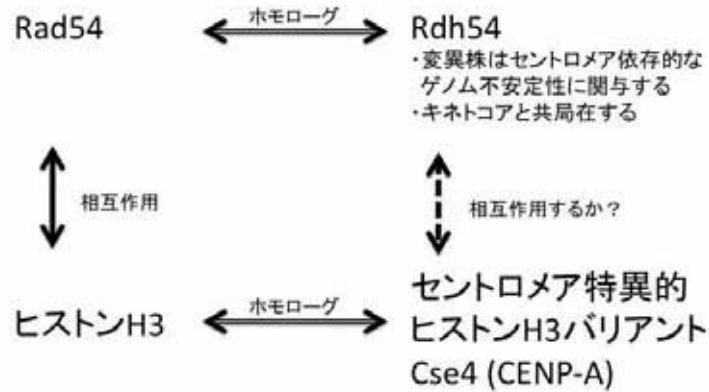
要約

酵母のクロマチンリモデリングファクター**Rdh54**は、従来考えられていた相同組換えにおける機能のみならず、セントロメア領域を介してゲノムの安定化に寄与するとの知見を得て、この新規の機能について解析を進めている。本研究では、**Rdh54**が直接セントロメア特異的なタンパク質**Cse4**と相互作用する事を明らかにし、さらに、それぞれのタンパク質における結合領域を特定した。**Rdh54**のホモログ**Rad54**も**Cse4**と相互作用するが、**Cse4**を断片化して解析すると**Rdh54**のみと特異的に結合する領域が得られ、最終的には**Cse4**中央部の21アミノ酸残基に特定された。アミノ酸置換により、結合には領域内の複数の**Lys**残基の正の荷電が関与していることが示唆された。一方、**Rdh54**の**Cse4**結合領域は中央部の約300アミノ酸残基となり、ヒストン**H3**との結合領域とは異なることが分かった。以上の結果をもとに、酵母細胞内での**Rdh54**と**Cse4**間の相互作用とゲノム安定化機構との関わりについて解析を進める予定である。

研究目的

転写やDNA修復、複製等の染色体上での生物機能が営まれる際には、クロマチン構造を解消する必要がある。ヒストンやその他のDNA結合タンパク質をゲノムDNAから外すことをクロマチンリモデリングと呼び、生物機能毎に特異的なクロマチンリモデリングファクターが知られている。酵母の**Rad54**と**Rdh54**はともに**Swi/Snf**ファミリーのクロマチンリモデリングファクターであり、共に相同組換えに関与している。**Rad54**については試験管内ヌクレオソームリモデリング活性に加え、ヒストン**H3**と直接相互作用することも分かっている。我々の研究室では、酵母二倍体細胞を用いたゲノム安定性の解析から、相同組換えが欠損している**Rad52**の欠失株において、**Rdh54**をさらに欠損させると染色体喪失が上昇することを見出した。さらにこの株では、セントロメア配列に依存してプラスミド喪失が上昇し、**Rdh54**はセントロメア領域を介して染色体の安定化に寄与することが示唆された。**Rdh54**はキネトコアタンパク質と共局在するとの報告があることから、**Rdh54**の新規機能について、**Rdh54**がセントロメア特異的なヒストン**H3**バリエーションである**Cse4**と相互作用することで作用しているとの作業仮説を立てた(図1)。つまり、**Cse4**を含むセントロメア特異的なヌクレオソーム構造のクロマチンリモデリングに**Rdh54**が必要とされるのではないかと仮説である。そこでまず、**Rdh54**と**Cse4**が特異的に相互作用するのかについて検証した。

図1 作業仮説



方法

A. 細胞内局在解析

酵母細胞内で、Rdh54 の C 末端に YFP (Yellow Fluorescence Protein) を融合させた Rdh54-YFP、ならびに、Cse4 の C 末端に CFP (Cyan Fluorescence Protein) を融合させた Cse4-CFP を同時に発現させ、蛍光顕微鏡でその局在を観察した。

B. 試験管内相互作用解析

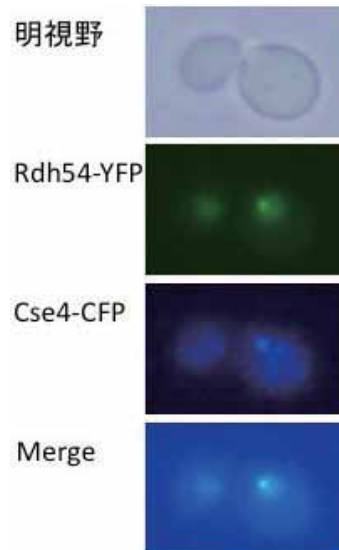
酵母の Rad54 と Rdh54、及びそれぞれを断片化した部分ポリペプチドについては、His タグもしくは MBP タグを N 末端に付加したポリペプチドとして大腸菌で過剰発現し、Ni²⁺ビーズもしくはアミロースビーズを用いて精製した。ヒストン H3 と Cse4、及びそれぞれを断片化した部分ポリペプチドについては、GST タグを N 末端に付加したポリペプチドとして大腸菌で過剰発現し、グルタチオンビーズを用いて精製した。精製標品を混和後、グルタチオンビーズでプルダウンし、SDS-PAGE と CBB 染色により相互作用を観察した。必要に応じてタグに対する抗体によるウェスタンブロッティングを用いた (図5、括弧内)。

結果と考察

A. 細胞内局在解析

Rdh54 は酵母細胞内で Rdh54 はキネトコアタンパク質である Mtw1 と共局在することが知られている。そこで、Rdh54 が酵母細胞内でセントロメア特異的なヒストン H3 バリエントである Cse4 と共局在するか検討した。Rdh54 の C 末端に YFP (Yellow Fluorescence Protein) を融合させた Rdh54-YFP を発現させ、同時に Cse4 の C 末端に CFP (Cyan Fluorescence Protein) を融合させた Cse4-CFP を発現させ、蛍光顕微鏡でその局在を観察した。酵母細胞内でセントロメアは核内の中央付近の一部分に集まる (セントロメアクラスタリング)。図2に示すように、Rdh54 と Cse4 の共局在が観察された。

図2 Rdh54 と Cse4 の共局在



B. 完全長タンパク質間の相互作用解析

クロマチンリモデリングファクターRdh54 とセントロメアとの関係を明らかにするため、Rdh54 とセントロメア特異的ヒストン H3 バリエント Cse4 の相互作用を検討するとともに、対象実験としてそれぞれのホモログ Rad54 とヒストン H3 を加えて解析を行なった。既に報告されている Rad54 とヒストン H3 の相互作用に加え、Rdh54 とヒストン H3、Rad54 と Cse4、Rdh54 と Cse4 間の相互作用が明らかとなった。

C. Cse4 の Rdh54 特異的結合領域の特定

Rdh54 と Cse4 間の相互作用について、Cse4 (全長 229 アミノ酸残基) を断片化し Rdh54 と特異的に結合する領域を同定した (図 3、4)

- Cse4 の 109 番目から 129 番目のアミノ酸残基で Rdh54 と強い相互作用を示した。
- 上記 21 アミノ酸残基中の 4 つのリシン残基をアラニン残基に変換すると Rdh54 との相互作用は失われるが、アルギニン残基への変換では元と同様の相互作用を示し、正の荷電が重要であることが示唆された。
- 特定された Rdh54 との相互作用領域のポリペプチドに対して Rad54 は相互作用を示さず、この領域は Rdh54 に対して特異的に相互作用することが分かった。
- Rdh54 との相互作用領域はヒストン H3 には該当する領域が無く、また、必須遺伝子 CSE4 中の必須領域にも該当しない。
- Rad54 と Cse4 との相互作用については、ヒストン H3 ホモログ領域を含めた領域が必要であり、Rad54 とヒストン H3 の相互作用を反映したものである可能性がある。

図3 Cse4 の Rdh54 特異的結合領域の同定

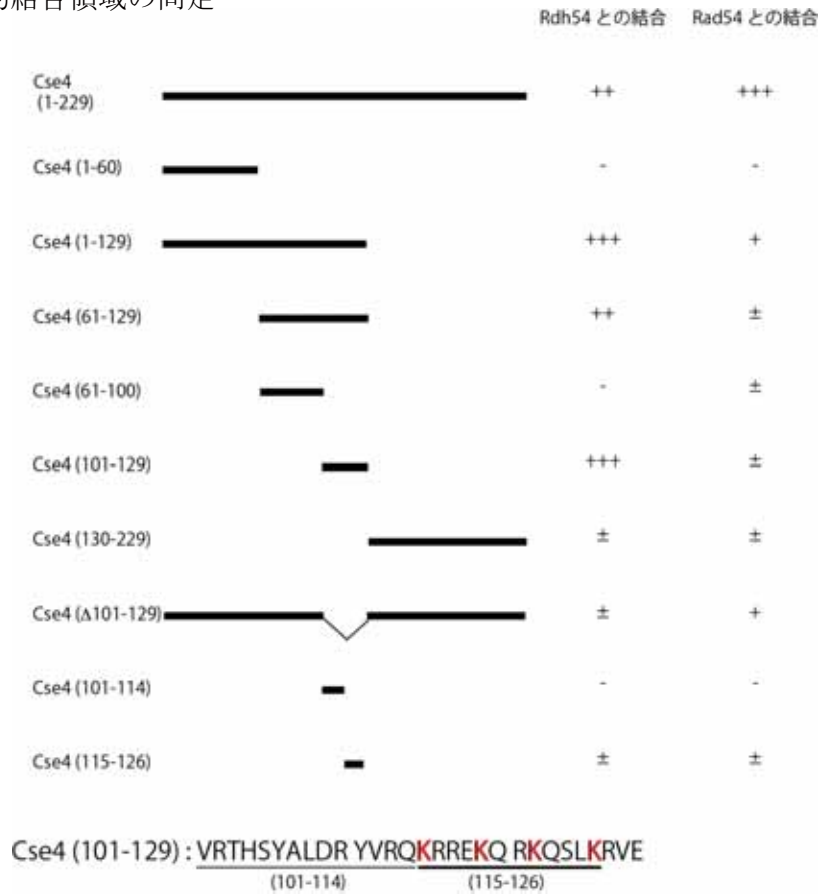
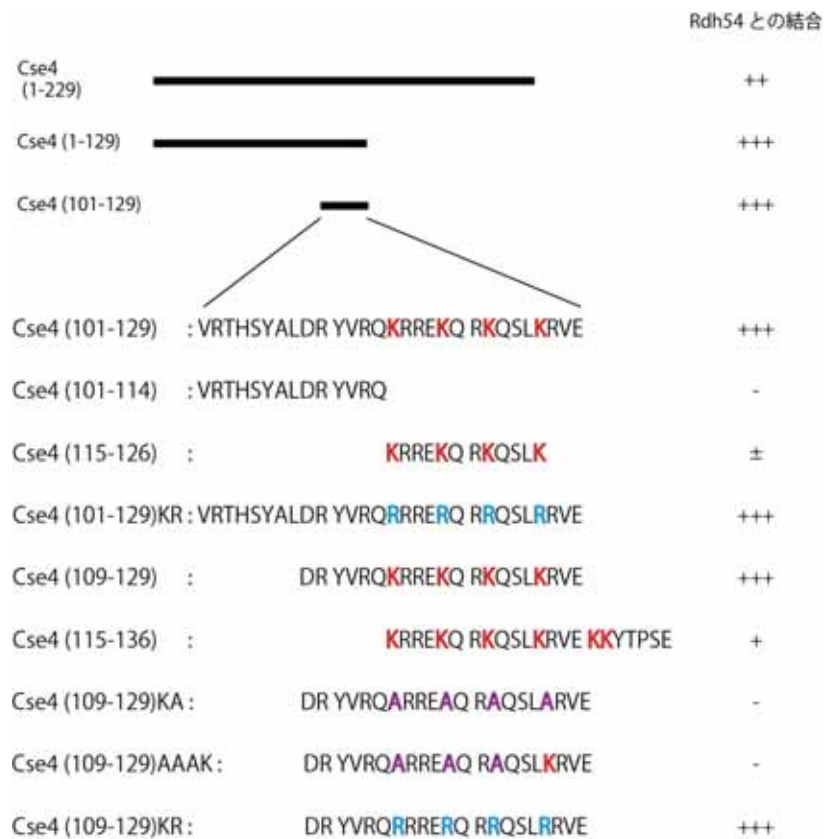


図4 Cse4 の Rdh54 特異的結合領域のアミノ酸置換解析



D. Rdh54 の Cse4 特異的結合領域の特定

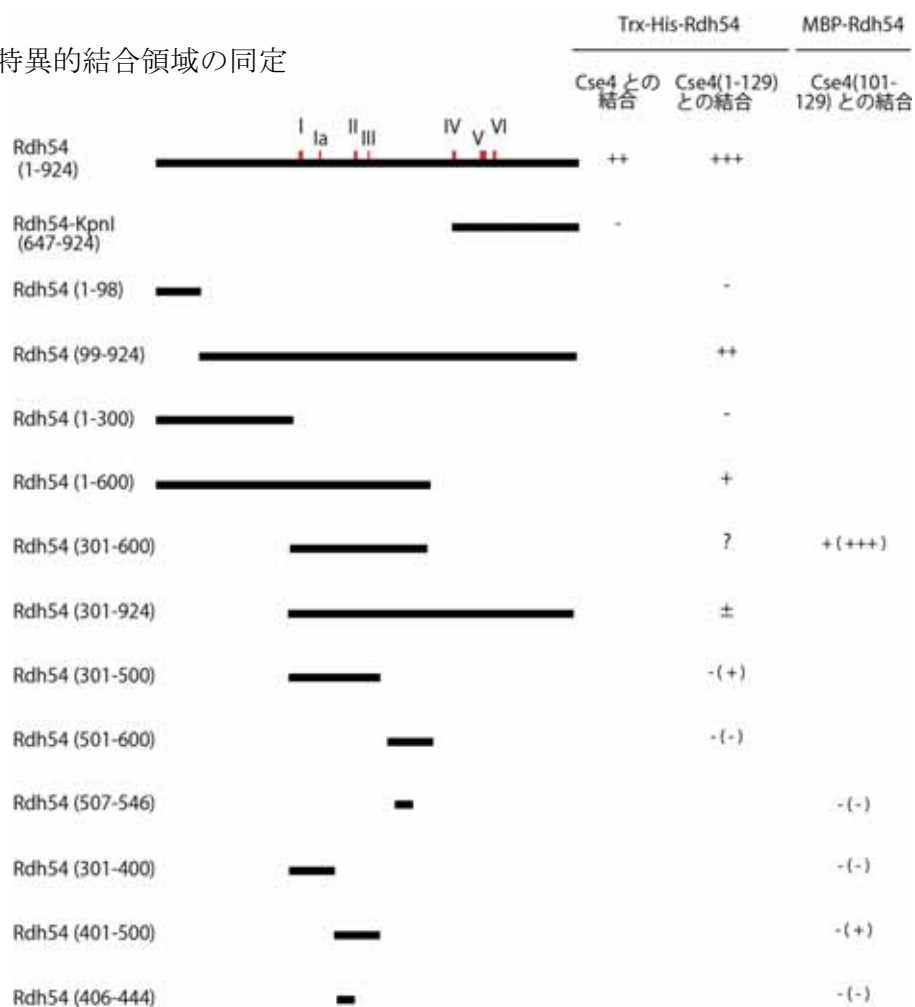
上記 C で特定された Cse4 の 21 アミノ酸残基からなるポリペプチドを用い、Rdh54（全長 924 アミノ酸残基）を断片化し Cse4 と特異的に結合する領域を同定した（図 5）。

- Rdh54 の 301 番目から 600 番目のアミノ酸残基で Cse4 断片と相互作用を示した。ただし、完全長よりも相互作用は弱い。
- 上記 300 アミノ酸残基のポリペプチドについて、特に酸性アミノ酸残基の存在に着目して断片化解析を行なったが、同等の相互作用を示す断片は特定できなかった。
- 上記の相互作用領域は Rdh54 のヒストン H3 との相互作用領域とは異なっていた。

以上より、Rdh54 と Cse4 とは互いに特異的な領域によって相互作用することが示された。

現在、酵母の粗抽出液における Rdh54 や Cse4 の相互作用因子について上記同様のタグによるプルダウン法で確認中である。また、必須遺伝子 *CSE4* について Rdh54 との相互作用を特異的に失った機能分離変異株が作成できる可能性が示されたことから、この変異株の作製・解析を通じて Rdh54-Cse4 の相互作用とゲノム安定性との関係を特定していく予定である。

図 5 Rdh54 の Cse4 特異的結合領域の同定



学会発表

クロマチンリモデリング因子とゲノムの安定な維持：Cse4 を介した Rdh54 の機能。
林 道夫、石橋 一成、梅津 桂子、第 36 回日本分子生物学会、神戸、2013 年 12 月。

酸化ストレスによるアポトーシス：ウェルナー症候群原因遺伝子 WRN の欠損による増強。
石橋 一成、林 道夫、梅津 桂子、第 36 回日本分子生物学会、神戸、2013 年 12 月。

研究課題	環境因子の遺伝系への作用 口腔粘膜の老化機構と発がんとの関係についての研究
研究代表者	池邊 哲郎（口腔・顎顔面外科学講座・口腔外科学分野・教授）

要約

口腔粘膜の発がんには、炎症等で発生した活性酸素（ROS）により口腔粘膜上皮細胞（ケラチノサイト）の DNA が酸化され、DNA 複製のミスマッチが関与するが、正常細胞は ROS に対する様々な防御反応を有する。その防御反応の 1 つが細胞老化であると考えられる。細胞老化には多様な特徴が含まれるが、最も重要な特徴は不可逆的な細胞周期の停止である。正常細胞は ROS により DNA にダメージを受けても細胞老化することによってがん化を防いでいると言える。逆に言うと、がん細胞は細胞老化を回避しているであろう。そこで、正常ケラチノサイトと口腔扁平上皮癌細胞とを培養し、ROS（過酸化水素）で処理して、細胞老化機構の違いを比較した。その結果、正常ケラチノサイトでは ROS により細胞老化マーカーである P16(INK4a) と P21(cip1) の発現が亢進したが、口腔扁平上皮癌細胞では P21(cip1) のみ亢進し、P16(INK4a) には変化がなかった。正常ケラチノサイトと口腔扁平上皮癌細胞の違いは P16(INK4a) の発現にあることが示唆されたため、P16(INK4a) の発現を調節するエピジェネティック状態を調べると、正常ケラチノサイトでは ROS によって P16(INK4a) のプロモーター領域のメチル化レベルが低下していた。メチル化抑制によって P16(INK4a) の発現が増加することが考えられた。同時に正常ケラチノサイトでは ROS によってメチル化酵素 DNMT1 の発現が抑制されていたため、DNMT1 発現亢進がメチル化抑制の原因と考えられた。一方、口腔扁平上皮癌細胞ではメチル化抑制も DNMT1 発現亢進も見られなかった。

研究目的

細胞に対する酸化ストレスである ROS に対する正常口腔粘膜（正常ケラチノサイト）のストレス防御機構と発がんのメカニズムを明らかにするために、正常ケラチノサイトの細胞老化機構とエピジェネティック修飾を検討する。正常ケラチノサイトと口腔扁平上皮癌細胞とを培養し、ROS（過酸化水素）で処理して、細胞老化機構、特に細胞老化マーカー発現の違いを比較し、その違いの原因を探索する。また、口腔扁平上皮癌細胞の分化程度とエピジェネティック修飾との関係を検討し、発がん予測との関係を調べる。

方法

- 1) 過酸化水素（ROS）で処理された正常ケラチノサイト（NHEK）と口腔扁平上皮癌細胞から mRNA を分離し、DNA マイクロアレイによって発現遺伝子の相違を比較する。
- 2) 正常ケラチノサイト（NHEK）と口腔扁平上皮癌細胞とを過酸化水素で処理し、細胞

老化マーカーSA-β-galactosidase の発現を調べる。

3) 正常ケラチノサイト (NHEK) と口腔扁平上皮癌細胞とを過酸化水素で処理し、p53^{TP53}、p21^{cip1}、p16^{INK4a} の発現を RTPCR および Western blotting で解析する。

4) 正常ケラチノサイト (NHEK) と口腔扁平上皮癌細胞とを過酸化水素で処理し、DNAメチル化酵素 DNMT1 の発現を RT-PCR および Western blotting で解析する。

5) 正常ケラチノサイト (NHEK) と口腔扁平上皮癌細胞とをメチル化インヒビター5-Azacで処理し、p53^{TP53}、p21^{cip1}、p16^{INK4a} の発現を RT-PCR および Western blotting で解析する。

6) 正常ケラチノサイト (NHEK) と口腔扁平上皮癌細胞とを過酸化水素で処理し、p16^{INK4a} 遺伝子プロモーターのメチル化レベルを解析する。

7) 分化程度の異なる口腔扁平上皮癌細胞のケラチン 13 遺伝子発現と同遺伝子のクロマチン修飾 (ヒストン修飾) とを比較する。

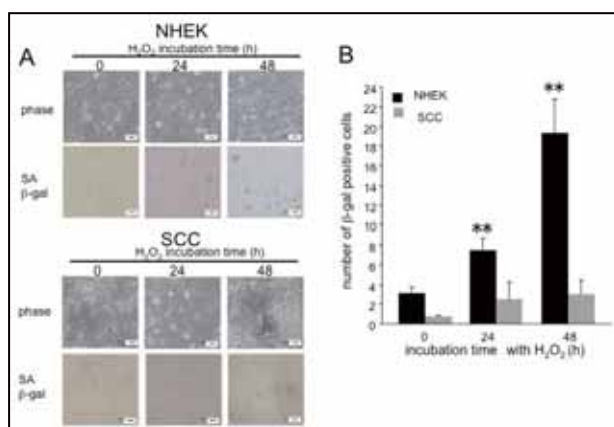
結果と考察

・ 正常ケラチノサイト (NHEK) と口腔扁平上皮癌細胞 (SCC) との比較

(1) DNA マイクロアレイ：過酸化水素処理により p21^{cip1} と p16^{INK4a} の発現は SCC よりも NHEK の方が亢進していた。

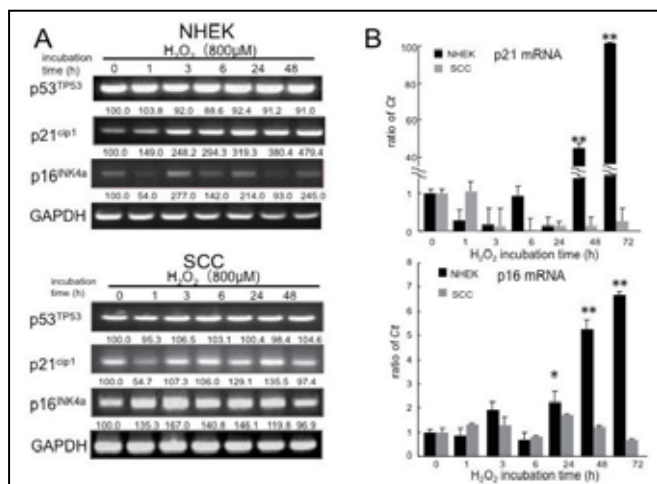
Entrez gene symbol	GeneBank accession No.	Fold change	
		NHEK	SCC
p53 (TP53)	NM_000546	0.6308215	1.2258246
p21 (CDKN1A)	NM_078467	2.7392757	1.2457686
p16 (CDKN2A)	NM_058197	1.7523187	0.940313
CDK6	NM_001259	0.4435822	1.2457686
CDK4	NM_000075	0.5053371	1.2258246
CDK2	NM_001798	0.9827361	0.9403130

(2) SA-β-galactosidase (SA-β-gal) の発現：過酸化水素処理により NHEK の SA-β-gal 発現が見られたのに対し SCC では SA-β-gal 発現が見られなかった。NHEK は ROS により細胞老化するが、がん細胞は細胞老化しないことが示された。

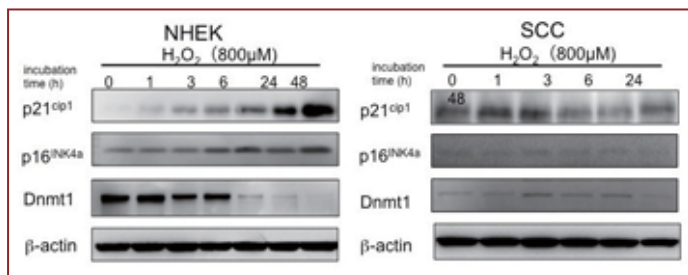


(3) p53^{TP53}、p21^{cip1}、p16^{INK4a} の発現：過酸化水素処理によって、NHEK と SCC ともに p53^{TP53} の発現に変化はなかった。しかし、p21^{cip1} と p16^{INK4a} の発現は NHEK で上昇

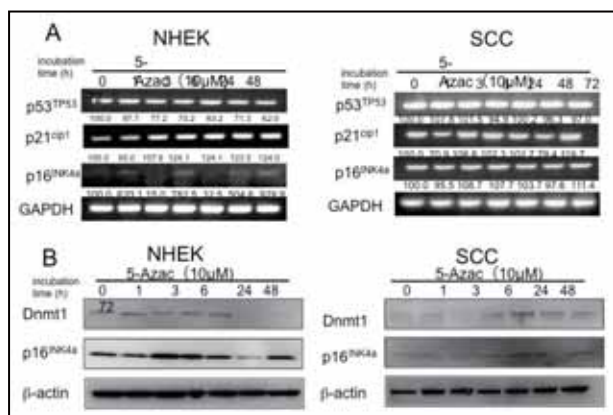
し、SCC では変化がなかった。p21^{cip1} と p16^{INK4a} とは共に細胞老化による細胞周期停止に
関与していることが報告されているため NHEK では ROS により細胞老化が生じ、SCC は
細胞老化しないことを反映している。



(4) DNMT1 の発現: 過酸化水素処理によって NHEK の DNMT1 発現が抑制されたが、
SCC の DNMT1 発現には変化がなかった。NHEK では ROS により遺伝子のメチル化レベ
ルが減少することが示唆された。

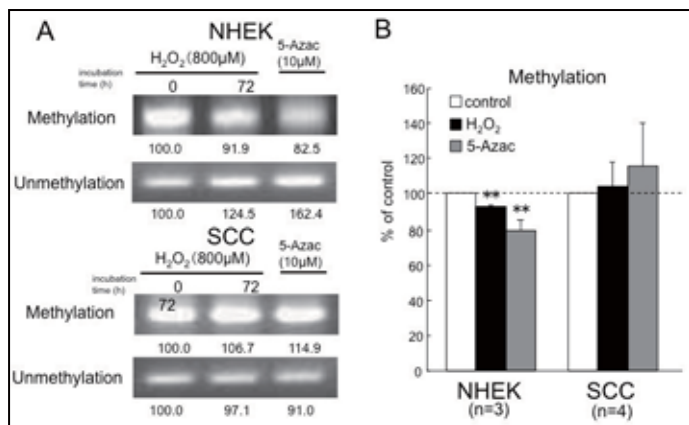


(5) メチル化インヒビター 5-Azac の効果: 5-Azac で細胞を処理すると、NHEK では
p21^{cip1} と p16^{INK4a} の発現が上昇したが、SCC では変化がなかった。ROS による p21^{cip1} と
p16^{INK4a} の発現、つまり細胞老化には遺伝子のメチル化が関与していることが考えられた。



(6) p16^{INK4a} のプロモーター領域のメチル化: 過酸化水素処理によって、NHEK では
p16^{INK4a} プロモーター領域のメチル化レベルの低下が見られたが、SCC では変化が見られ

なかった。



発表論文

1. Okamoto Y, Ohkubo T, Ikebe T, Yamazaki J. Blockade of TRPM8 activity reduces the invasion potential of oral squamous carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 40: 1431-1440, 2012.
2. Ikebe T, Yamasaki K, Takamune Y, Nakayama H, Shinohara M. Reduced expression of nuclear factor κB in oral mucosa undergoing preoperative chemoradiotherapy. *Oral Science Int* 9: 33-37, 2012.
3. Fukawa T, Kajiya H, Ozeki S, Ikebe T, Okabe K. Reactive oxygen species stimulates epithelial mesenchymal transition in normal human epithelial keratinocytes via TGF-beta secretion. *Exp Cell Res* 318: 1926-1932, 2012.
4. Tanaka T, Nakayama H, Yoshitake Y, Irie A, Nagata M, Kawahara K, Takamune Y, Yoshida R, Nakagawa Y, Ogi H, Shinriki S, Ota K, Hiraki A, Ikebe T, Nishimura Y, Shinohara M. Selective inhibition of nuclear factor-κB by nuclear factor-κB essential modulator-binding domain peptide suppresses the metastasis of highly metastatic oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 103: 455-463, 2012.
5. Ota N, Izumi K, Okamoto Y, Toshitani K, Nakayama K, Fukuzawa H, Ozeki S, Ikebe T. Tapia's syndrome following the orthognathic surgery under general anaesthesia. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 25:52-54, 2013.

学会発表

1. 佐々木三奈、長岡良礼、永沼香織、太田信敬、府川晃久、中山修二、山下善弘、大関

悟、池邊哲郎 酸化ストレスに対するがん抑制遺伝子を介した細胞老化誘導作用
第 67 回日本口腔科学会学術集会 2013 年 5 月 23 日 宇都宮市

2. 佐々木三奈、森 紘一郎、永嶋勝之、田中文恵、長岡良礼、永沼香織、勝俣由里、太田信敬、府川晃久、利谷幸治、橋本憲一郎、泉 喜和子、内田竜司、池邊哲郎、大関悟 正常角化上皮細胞の上皮間葉移行における IKKalpha シグナルの関与
第 68 回日本口腔科学会学術集会 2014 年 5 月 8 日 東京都
3. 佐々木三奈、永沼香織、竹山顕子、勝俣由里、太田信敬、府川晃久、岡本愛彦、橋本憲一郎、池邊哲郎、大関 悟 酸化ストレスに対するがん抑制遺伝子 p16 の発現調節を介する細胞老化誘導作用
第 32 回日本口腔腫瘍学会学術集会 2014 年 1 月 24 日 札幌市

研究課題	口腔の加齢変化の個体差と骨基質の関係
研究代表者	佐藤 博信（咬合修復学講座・冠橋義歯学分野・教授）

要約

咀嚼機能による特有な力学的環境にある顎骨は、リモデリングのスピードが速いなどの特有の代謝を営んでいる。その代謝の最終産物であるコラーゲンは骨に柔軟性を与え、コラーゲンの翻訳後修飾であるリジンの水酸化の程度は骨の質的性状を左右する。ヒト献体の下顎骨、上腕骨および大腿骨のコラーゲン量（ $\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥骨）とリジンの水酸化の程度（水酸化リジン量： mol/mol コラーゲン）を定量分析したところ、下顎骨は特有のコラーゲン性状を有することがわかった。いずれの骨においてもコラーゲン量と水酸化リジン量に加齢変化も性差も認められなかった。下顎骨のコラーゲン量は多く、反対に水酸化リジン量は少なかった。コラーゲン量と水酸化リジン量には大きな個人差があったが、下顎骨の水酸化リジン量では個人差が小さかった。コラーゲン量の多い下顎骨は咀嚼に対する柔軟性を有している可能性があり、下顎骨特有の力学的環境が粗面小胞体での翻訳後修飾因子やコラーゲンシャペロンに影響し、リジンの水酸化を低下させ、コラーゲン線維形成に影響している可能性が推測される。

研究目的

顎骨は他の全身の骨と同様に、骨量とその加齢変化に大きな個体差を示す。骨には部位特異性があることが知られており、その特異性には力学的因子が大きく寄与する。顎骨に加わる力のほとんどは歯を介しており、咀嚼によって加わる力は歩行時の下肢骨に加わる力の2倍ほどで、またクレンチングによって頻繁に、かつ複雑な方向に力が加わることから、顎骨は力学的に四肢骨とは異なった環境下にあるといえる。顎骨は四肢骨よりもリモデリングスピードが速く（イヌでは、下顎骨で6倍、上顎骨で3倍速い）、mesenchymal stem cellの骨形成能が高いことが報告されており、それらは顎骨特有の環境因子が関係していると考えられている。

骨代謝の最終産物であるコラーゲンは骨の骨格を担う基質タンパクであり、ミネラルが硬さを与えるのに対し、コラーゲンは柔軟性を与える。コラーゲンはその量のみならずコラーゲンの質的性状によって骨強度に大きく影響する。コラーゲンの翻訳後修飾の程度はコラーゲン分子の集合性に影響を与え、引き続き起こる分子間の架橋とコラーゲン線維形成に影響する。ミネラルはコラーゲン分子によって構築されたテンプレートの性状によって、その沈着と成長に影響を受けるため、結果として骨の強度が左右される。コラーゲン翻訳後修飾の一つであるリジン残基の水酸化は lysyl hydroxylase (LH) の酵素活性によ

って特異的に起こり、形成された水酸化リジンにさらに酵素特異的な糖鎖の添加がなされ、その結果コラーゲン線維の形成が制御される。骨が脆弱化する骨粗鬆症や骨形成不全症の骨ではこのリジン残基の水酸化の程度が大きくなることがヒトの知見で明らかにされており、我々は骨粗鬆症モデルマウスの下顎骨でリジン残基の水酸化の亢進と同時にコラーゲン線維が狭小化していることを明らかにした (Tokutomi et al. *Connective Tissue Research* 2008;49:361-366)。

以上のように、コラーゲンはその量とリジン残基の水酸化の程度が骨基質の性状に影響を与えることから、四肢骨とは異なる環境下にある顎骨がその環境に適合した特有のコラーゲン性状を有していると推測される。その特有な性状を理解することはエビデンスをベースとした歯科医療の発展に大きな意味を持つ。本研究の目的は、ヒト献体の下顎骨のコラーゲン量とコラーゲンリジン残基の水酸化の程度をアミノ酸分析によって定量し、上腕骨と大腿骨のそれらと比較することにより、顎骨コラーゲンの特異性を明らかにすることである。

方法

福岡歯科大学に教育と研究のために提供された献体 49 体 (男性 28 体、女性 21 体) の下顎骨 (n=48)、上腕骨 (n=48) および大腿骨 (n=46) を研究に供した。それぞれ研究の対象部位として頻用され、かつ皮質骨と海綿骨の割合が近似する下顎骨オトガイ部、上腕骨と大腿骨の近位骨端頸部の皮質骨を研究の対象部位とした。採取した皮質骨を液体窒素下で微粒子に粉砕し、凍結乾燥させた。乾燥試料をアミノ酸分析に用い、ヒドロキシプロリン (Hyp) 量からコラーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥骨) を算出し、ヒドロキシリジン (Hyl) 量からコラーゲン 1 分子当たりのリジン残基の水酸化の程度 (Hyl mol/mol コラーゲン) を算出した。各骨におけるコラーゲン量とリジン残基の水酸化の程度の個人差の程度と加齢変化を調べ、また 3 骨間の量的比較と 2 骨間の相関関係を調べた。量的比較には Kruskal-Wallis 検定を、相関関係の検査には Pearson の相関係数を用いた検定を行った。

結果と考察

1. 下顎骨、上腕骨および大腿骨のコラーゲン量

コラーゲン量はいずれの骨においても大きな個人差が認められ、性差と加齢変化は認められなかった (図 1)。コラーゲン量は下顎骨、上腕骨、大腿骨の順に多く、下顎骨と大腿骨の間に有意差が認められた。下顎骨では、その豊富なコラーゲン量によって歯を介した力を許容する柔軟性が付与されている可能性が示唆された。

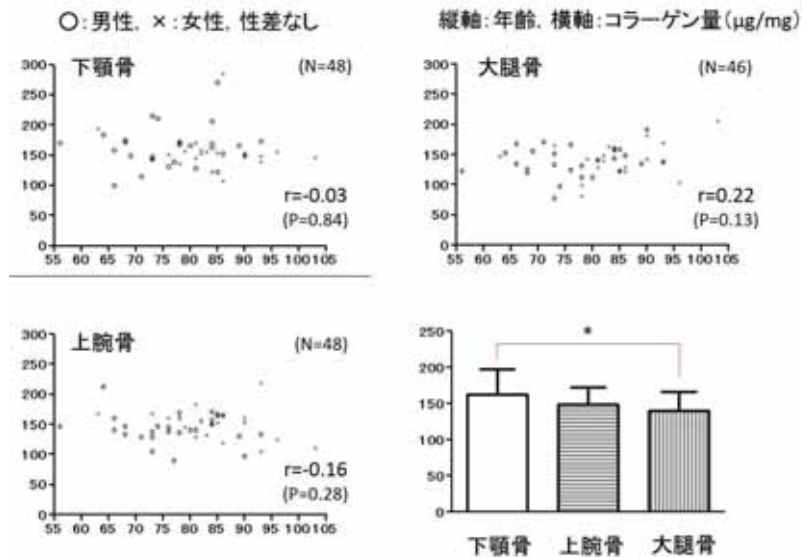


図1. 下顎骨、上腕骨および大腿骨のコラーゲン量

また、2骨間の相関関係はいずれの組み合わせでも相関係数が低く、明らかな関連は認められなかった（図2）。この非相関性は下顎骨、上腕骨および大腿骨のそれぞれの異なった力学的環境を反映している可能性があり、下顎骨のコラーゲン量が多ければ、大腿骨でも多いというような単純な推測が必ずしもできないことが示された。

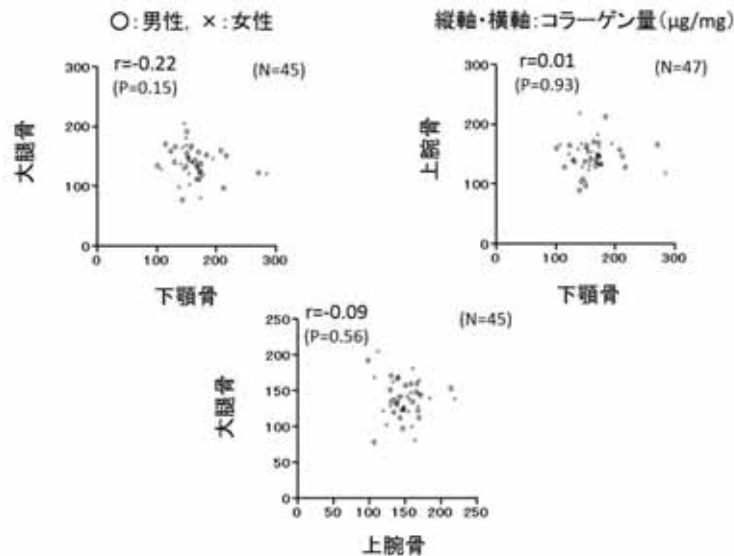


図2. コラーゲン量の2骨間の相関関係

2. 下顎骨、上腕骨および大腿骨のリジン残基の水酸化の程度

リジン残基の水酸化の程度はいずれの骨においても性差と加齢変化が認められなかった。上腕骨と大腿骨においては大きな個人差が認められたが、下顎骨での個人差は非常に小さかった（図3）。また、リジン残基の水酸化の程度は、上腕骨と大腿骨が同レベルであったのに対し、下顎骨では有意に低いレベルであった。

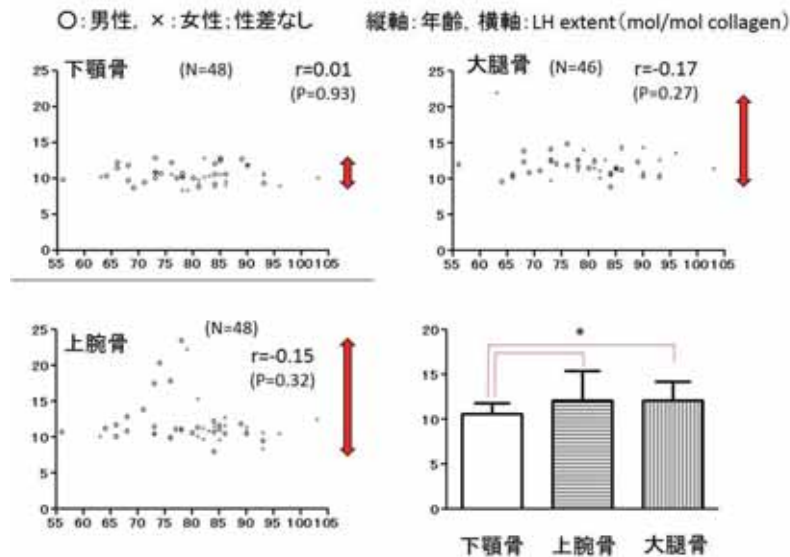


図3. 下顎骨、上腕骨および大腿骨のリジン残基の水酸化の程度

2骨間の相関関係は下顎骨と上腕骨、下顎骨と大腿骨の間では低い相関係数を示したが、上腕骨と大腿骨の間ではやや相関性を思わせる相関係数 ($r=0.20$ 、 $p=0.19$) であり、特に男性では有意な相関性が示された (図4、 $r=0.46$ 、 $p=0.02$)。このことから、上腕骨や大腿骨で大きな個人差を示すリジン残基の水酸化の程度は、下顎骨では有意に低いレベルとなり、個人差が小さくなる様相が明らかとなった。

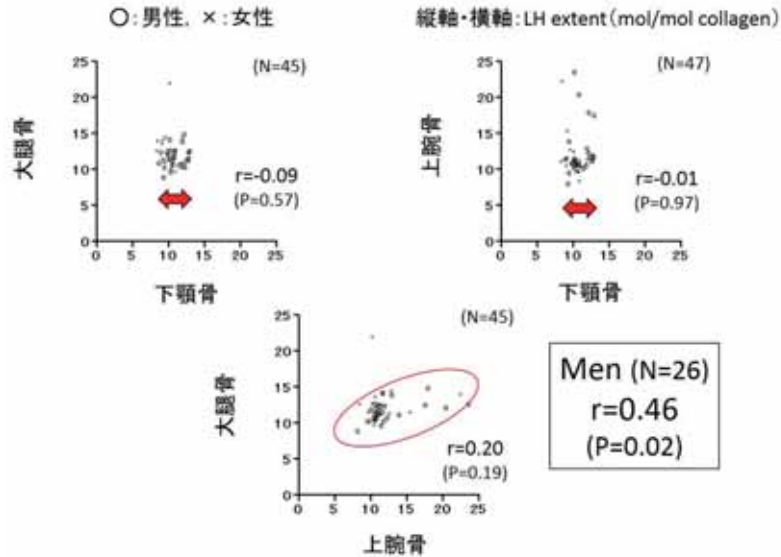


図4. リジン残基の水酸化の程度の2骨間の相関関係

リジン残基の水酸化は、コラーゲン鎖が粗面小胞体で形成され始めてから3重螺旋構造が形成されるまでの間に、lysyl hydroxylase の酵素の働きを介してなされる。従って、下顎骨での低いリジン残基の水酸化の程度は、(1) lysyl hydroxylase の発現の低下あるいは酵素活性の抑制によって、あるいは(2) 3重螺旋構造の形成スピードの促進によ

て、なされている可能性が推測される。

リジン残基の水酸化の程度が大きくなると、コラーゲン線維は細くなるのが種々の研究知見として明らかになっている。下顎骨でのリジン残基の水酸化の程度の低下はコラーゲン線維が太い可能性を暗示しており、コラーゲン量の増加も考慮するとその可能性がより示唆される。下顎骨でのリモデリングスピードを考慮すると、一見矛盾しているように見えるが、下顎骨のコラーゲンの架橋は大腿骨と比べて未熟型が多く、成熟型が少ない (Tokutomi et al. *Connective Tissue Research* 2008;49:361-366)。コラーゲン分解酵素は未熟型よりも成熟型の多いコラーゲン線維を分解しにくいいため、たとえコラーゲン線維が太くても未熟型の多い下顎骨のコラーゲン線維は分解しやすいと考えることができる。

以上より、特殊な力学的環境下にある下顎骨のコラーゲンは、四肢骨のそれらと比べ、量が多く、リジン残基の水酸化の程度が小さいことが明らかとなった。これらの知見は、頻繁かつ複雑な力を受ける下顎骨の力学的環境にうまく適合した性状を示しているといえる。

発表論文

1. Distinct characteristics of mandibular bone collagen relative to long bone collagen: relevance to clinical dentistry. Matsuura T., Tokutomi K., Sasaki M., Katafuchi M., Mizumachi E., Sato H. *BioMed Res. Int.* 査読有、DOI: 10.1155/2014/769414, (2014) (in press)
2. Characterization of the bone matrix and its contribution to tooth loss in human cadaveric mandibles. Matsuura T., Sasaki M., Katafuchi M., Tokutomi K., Mizumachi E., Makino M., Naito T., Sato H. *Acta Odontol. Scan.* 査読有、DOI: 10.3109/00016357.2014.903517, (2014) (in press)
3. Sex-related differences in cortical and trabecular bone quantities at the mandibular molar. Matsuura T., Mizumachi E., Katafuchi M., Tokutomi K., Kido H., Matsuura M., Sato H. *J. Hard Tissue Biol.* 査読有、23, 267-274 (2014)
4. A multi-centered epidemiological study evaluating the reliability of the treatment difficulty indices developed by the Japan Prosthodontic Society. Kuboki T., Ichikawa T., Baba K., Hideshima M., Sato Y., Wake H., Nagao K., Ueda Y., Ono Y., Tamaki K., Tsuga K., Sakurai K., Sato H., Ishibashi K., Yatani H., Ohyama T., Akagawa Y., Hirai T., Sasaki K., Koyano K. *J. Prosthodont. Res.* 査読有、56, 71-86 (2012)

学会発表

1. 下顎骨の主要骨基質成分の部位特異性 ―四肢骨との比較―. 松浦尚志、佐々木美智子、水町栄美理、片渕 三千綱、佐藤博信. 日本口腔インプラント学会第 30 回九州支部学術大会、別府、2013 年 1 月.
2. 骨コラーゲンが歯の寿命に寄与する可能性. 松浦尚志、佐々木美智子、片渕 三千綱、徳富健太郎、石川美咲、新田悟、水町栄美理、佐藤博信. 第 121 回日本補綴歯科学会、横浜、2012 年 5 月.
3. ヒト献体下顎骨における骨基質中のコラーゲン量と残存歯数の関係. 松浦尚志、片渕 三千綱、徳富健太郎、新田悟、佐藤博信. 日本口腔インプラント学会第 29 回九州支部学術大会、宮崎、2012 年 1 月.

研究課題	硬組織代謝異常とシグナル伝達
研究代表者	岡部 幸司（細胞分子生物学講座・細胞生理学分野・教授）

要約

我々は、種々の骨破壊性疾患の中心的役割をなす破骨細胞のイオン輸送機構と骨吸収機能調節機構や歯牙のミネラル輸送と石灰化機構に関して以下の3つの課題に取り組んだ。

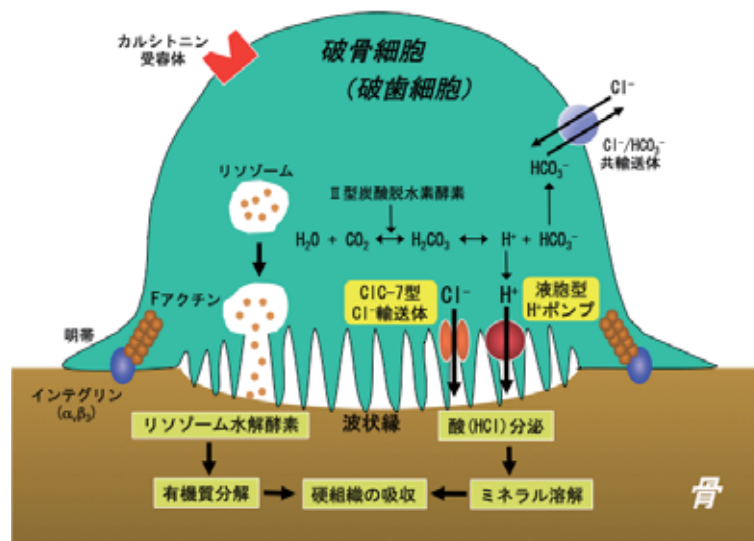
【課題1】破骨細胞の H^+ 放出や骨吸収に関わる重要な Cl^- 輸送分子である $ClC7$ 型 Cl^- 輸送体($Clcn7$)に対して、骨粗鬆症治療薬である窒素含有性ビスホスホネートがメバロン酸代謝経路を介してその Cl^- 輸送を投与後短時間で抑制を示すことを報告した。【課題2】破骨細胞の分化誘導に従って発現上昇する Ca^{2+} 透過性型陽イオンチャネルであるTRPM7の機能を解析した。TRPM7はキナーゼ活性を有するユニークなイオンチャネル分子であり、破骨細胞にはTRPM7を介する陽イオン輸送が優位に存在し、これは酸性環境で活性化され Mg^{2+} 投与でブロックされる性質を示すことが分かった。これも破骨細胞の分化や骨吸収機能に必要な Ca^{2+} シグナル形成やミネラル代謝に重要な機能分子である可能性があるが、現在、破骨細胞特異的なTRPM7欠損マウスを作成しin vivo実験系で検討している。【課題3】前述TRPM7の生体での発現分布を調べたところ、特に象牙芽細胞やエナメル芽細胞に極めて高発現することが明らかとなった。そこで、TRPM7分子の歯の石灰化におけるミネラル輸送と石灰化調節機構への関与を検討した。組織学的な解析、分子生物学的な解析において、マウス歯牙の象牙芽細胞やエナメル芽細胞にTRPM7が極めて高発現し、in vitro実験系にてTRPM7様のイオン輸送が存在することも確認できた。今後、TRPM7遺伝子改変マウスを用いたin vivo実験系も導入しさらに検討を進める。

研究目的

【課題1】骨吸収において主たる役割を果たしているのが血液幹細胞由来の破骨細胞で、吸収を行う際に、まず基質面に強く接着することで特徴的な波状縁を形成し骨吸収が起こる。

骨基質のミネラル成分は破骨細胞の分泌する酸（塩酸：HCl）により強酸性の環境を形成することで溶解し、有機成分はリソゾームより分泌された多くのリソ

図1 破骨細胞の酸（HCl）分泌機構



ゾーム水解酵素が酸性環境の中で活性化され分解を受ける。この酸 (HCl) 分泌にはプロトンポンプ (V-ATPase) を介する H⁺ 輸送と ClC7 型 Cl 輸送体 (Clcn7) を介する Cl 輸送がイオンカップリングすることで H⁺ と Cl⁻ のイオン輸送を担っている (図 1 参照)。また、この ClC7 遺伝子欠損マウスや Clcn7 の点変異が病因である常染色体優性大理石骨病 II 型 (ADO II) の患者では、Clcn7 を介する破骨細胞の Cl⁻ 分泌能が低下し、骨吸収障害が生じる。まさに Cl 輸送体は硬組織吸収の主体であり、この欠損や機能不全は骨吸収や歯牙交換に障害をもたらす病因となる。従って、こういった輸送体の特性や機能を知ることは病的骨吸収を制御する有用な創薬を検討する上でも重要な意義がある。近年、破骨細胞の骨吸収を強力に抑制する薬剤である窒素含有性ビスフォスフォネート (NBP) が、骨粗鬆症やがんの骨転移の治療に頻繁に用いられている。一方で、顎骨壊死等の副作用の問題が浮き上がり、歯科領域では深刻な問題を抱えている。こういった問題を解決するためには、NBP の作用機序を十分に理解しておく必要がある。この NBP の抑制作用はメバロン酸代謝におけるファーンシル二リン酸合成酵素 (Fdps) の抑制により、破骨細胞の細胞内骨格の形成阻害やアポトーシスを誘導すると報告されているが、酸分泌機能に対する効果については不明である。本研究は、こういった NBP の未知の作用機構を解明することを目的に、Clcn7 を介する Cl 輸送に対する NBP の作用を解析することにある。こういった取組は NBP の副作用予防や治療だけでなく、有用な骨代謝治療への創薬を検討する上でも意義がある。

【課題 2】これまで我々は破骨細胞のイオン輸送と骨吸収機能の調節に関する多くの研究を行い、破骨前駆細胞への RANKL 投与により Ca²⁺透過性陽イオンチャネルの一種である transient receptor potential (TRP) ファミリーに属する TRPV2 の発現が促進され、TRPV2 を介する Ca²⁺流入が Ca²⁺オシレーションを形成し

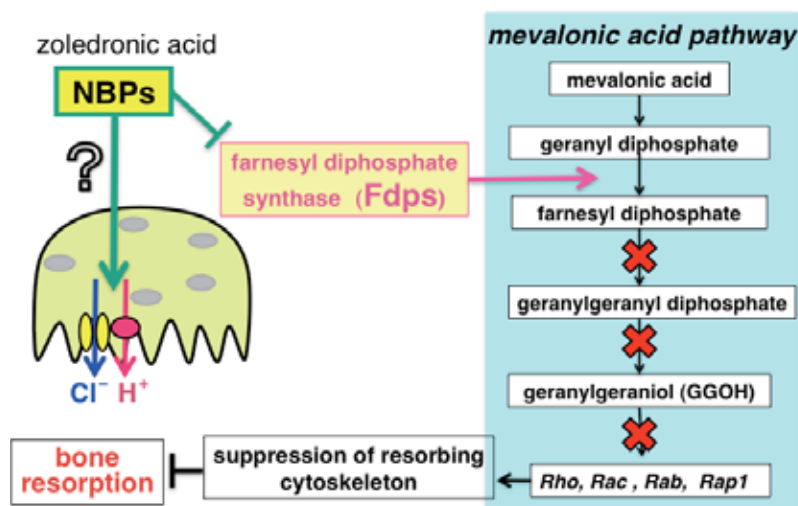


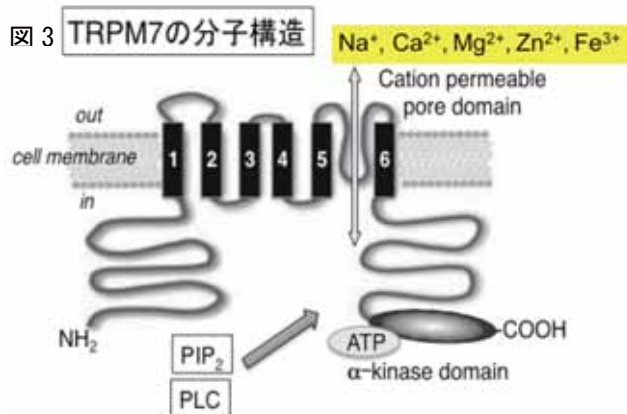
図 2 窒素含有性ビスフォスフォネート (NBP) の骨吸収抑制機序

calcineurin 及び NFATc1 の活性化を経て破骨細胞分化が誘導されることを報告した

(Kajiya et al. 2010)。一方、この研究の DNA マイクロアレイ解析において、TRPM ファミリー (Melastatin 受容体) に属する TRPM7 (図 2 参照) が TRPV2 と同様に RANKL 投与により破骨前駆細胞に優位に誘導され、分化と共に発現量が増加することや、TRPM 阻害剤により破骨細胞形成が抑制されることを発見したが、その機能は不明である。TRPM 7 は広範に発現する非選択性の陽イオンチャネルで Mg²⁺等に対する透過性が特段に高いことから、細胞

内ミネラル恒常性を担う輸送分子として注目されている。また、そのC末側に α キナーゼドメインを持ち酵素活性を有するユニークなイオンチャネルでもあり、細胞増殖、細胞接着運動、細胞死、発ガン等の多岐の生命現象に関わる必須分子であり、TRPM7欠損や α キナーゼドメイン変異のマウスは胎生致死となる。本研究は、我々が破骨前駆細胞に発見したミネラル輸送イオンチャネルであるTRPM7に注目し、この分子の破骨細胞の分化や骨吸収機能に必要な Ca^{2+} シグナル形成やミネラル代謝における機能を解明することにある。これらの取組は、ミネラル輸送分子を標的とした新規の骨吸収抑制療法への展開の基盤となるものと考えている。

【課題3】歯は上皮-間葉系の相互作用により主に象牙芽細胞とエナメル芽細胞から形成されるが、それぞれの石灰化過程やその維持機構を担う分子の同定は不明である。前述TRPM7の生体での発現分布を調べたところ、特に象牙芽細胞やエナメル芽細胞に極めて高発現することが認められた。そこで、本研究は歯牙の石灰化に関わる新規分子として、我々が生体中でも特に象牙芽細胞やエナメル芽細胞に極めて高発現するTRP分子として発見したキナーゼ活性を有するユニークな Ca^{2+} 透過型陽イオンチャネルであるTRPM7に注目し、この分子のミネラル輸送機構とこれに続く歯の石灰化調節機構への関与をin vitro実験系とin vivo実験系の双方で解明することにある。これらの取組みは、歯牙発育障害の病態解明や歯牙再生研究へ新しい指針を提供すると考えられる。



方法

【課題1】マクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞、及びマウス骨髄マクロファージにRANKLを作用させ破骨細胞を誘導した。Clcn7分子の破骨細胞分化過程に伴う発現量の変化をRT-PCR及びWestern blot法、免疫染色法を用いて調べた。Clcn7を介する Cl^- 分泌能は、ホールセルパッチクランプ法を用いて Cl^- イオン電流として記録し、ビスフォスフォネートの効果を解析した。また、メバロン酸代謝におけるファーネシル二リン酸合成酵素(Fdps)の関与を検討するために、テトラサイクリン誘導性Fdps-shRNAを発現させた細胞株を用いて、Clcn7イオン輸送に対するFdpsのサイレンシング効果を検討した。

【課題2】マウス骨髄マクロファージをRANKL刺激により破骨細胞へ誘導した。そして、RANKL刺激前と刺激48時間後における Ca^{2+} 輸送体の発現変化をDNAマイクロアレイ法によ

り比較すると共に、TRPM7 の破骨細胞分化過程に伴う発現量の変化を RT-PCR 及び Western blot 法を用いて調べた。また、RANKL 刺激した細胞と非刺激細胞へホールセルパッチクランプ法を適用し、TRPM7 阻害剤や細胞内外のイオン環境変化により、TRPM7 を介するイオン輸送をイオン電流として記録し、その性質や調節機構を解析した。

【課題 3】 In situ hybridization 法、RT-PCR 法、組織免疫染色法により、全身や組織、細胞における、TRPM7 の発現や分布を解析した。また、株化細胞より誘導した野生型の象牙芽細胞やエナメル芽細胞を用いて、TRPM7 発現を shRNA でサイレンシングした細胞株を樹立し、TRPM7 の機能を解析した。RT-PCR 法や Western Blotting 法により、細胞分化に特異的なタンパクの発現を解析した。アルカリフォスファターゼ染色や Von kossa 染色により、石灰化活性や石灰化沈着の解析を行った。ホールセルパッチクランプ法を適用し、TRPM7 阻害剤や細胞内外のイオン環境変化により、TRPM7 を介するイオン輸送をイオン電流として記録し、その性質や調節機構を解析した。

結果と考察

【課題 1】窒素含有性ビスホスホネート (NBP) の抑制作用

用はメバロン酸代謝におけるファーネシルニリン酸合成酵素 (Fdps) の抑制により、破骨細胞の細胞内骨格の形成阻害やアポトーシスを誘導すると報告されているが、酸分泌機能に対する効果については不明である。そこで、酸活性化 Cl^- 電流に対するビスホスホネートの効果について検討した結果、

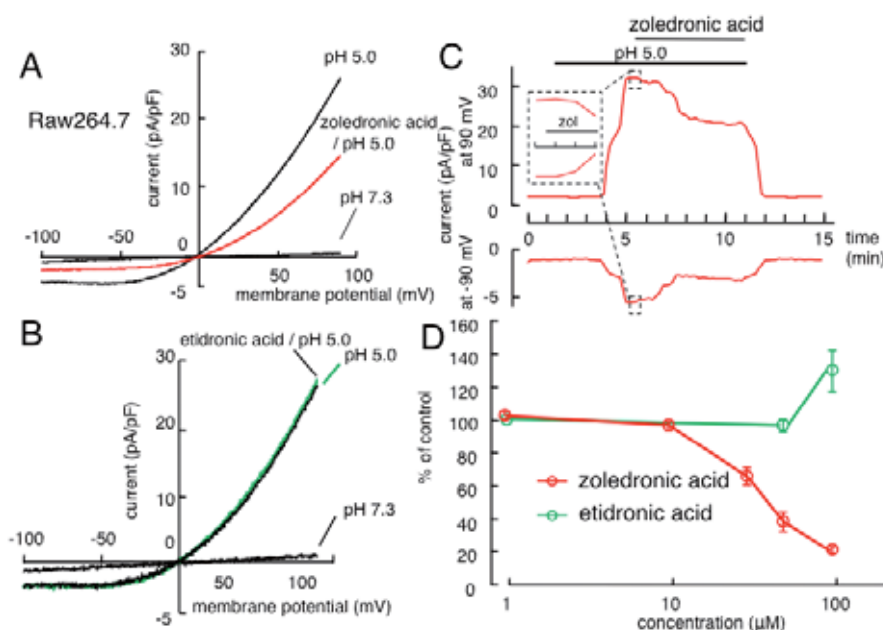


図 4 窒素含有性ビスフォスフォネートの Cl^- 輸送抑制作用

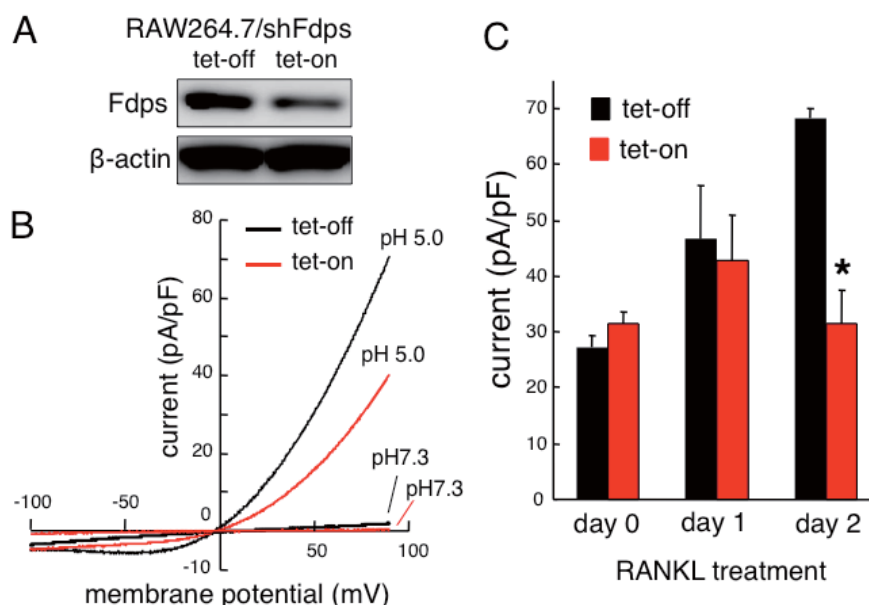


図 5 Fdps のサイレンシングによる Cl^- 輸送阻害作用

窒素含有性ビスホスホネート (NBP) であるゾレドロ酸やアレンドロネートは酸活性化 Cl⁻ 電流に対して急性的かつ濃度依存的な抑制作用を示したが、窒素非含有性ビスホスホネートであるエチドロ酸は作用を示さなかった (図 4 参照)。また、Fdps の shRNA を用いたサイレンシング (図 5 参照) やゲラニルゲラニル転換酵素の阻害剤 (GGTI) は Cl⁻ 電流を抑制

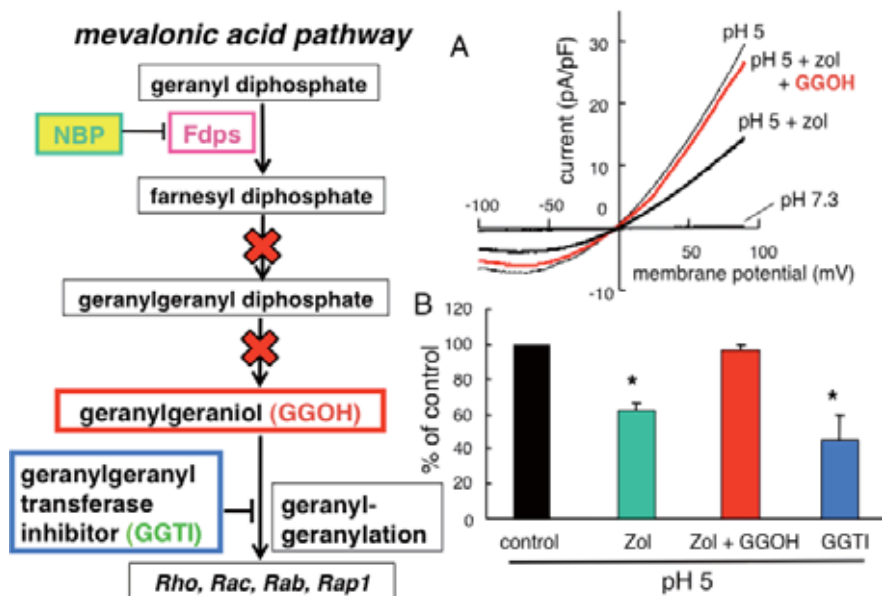


図 6 NBP の Cl⁻ 輸送抑制作用に対する GGOH の回復効果

したが、メバロン酸代謝産物のゲラニルゲラニル酸 (GGOH) 投与はゾレドロ酸による抑制作用を減弱した (図 6 参照)。従って、窒素含有性ビスホスホネートは破骨細胞の細胞内骨格形成抑制だけでなく、Fdps 阻害を介して早期に破骨細胞の Clcn7 等を介する酸分泌機能を抑制することが明らかとなり (図 7 参照)、これらの結果を報告した (発表論文 3 参照: Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2013)。この様な破骨細胞の Clcn7 を介する酸分泌機構の特性を解明することは、Clcn7 分子を標的とした骨修復を促進する新規の薬剤や治療法の開発への戦略としても意義があると考えられる。

現在、骨粗鬆症治療薬として汎用される窒素含有性ビスホスホネートは、強力な骨吸収抑制作用を有するが、一方で破骨細胞数を減少させ、長期使用により顎骨壊死等の副作用の問題を抱えていることより、破骨細胞を殺さず異常な骨吸収機能のみを適宜コントロールできる安全性の高い薬剤が求められている。現在、V-ATPase と Clcn7 の両輸送体分子の間には、この両者と複合体を形成し機能調節を行う共通分子の存在が明らかとなっており、今後、こういった両輸送体のカップリング分子を標的とした、より効率の良い創薬開発に期待したい。

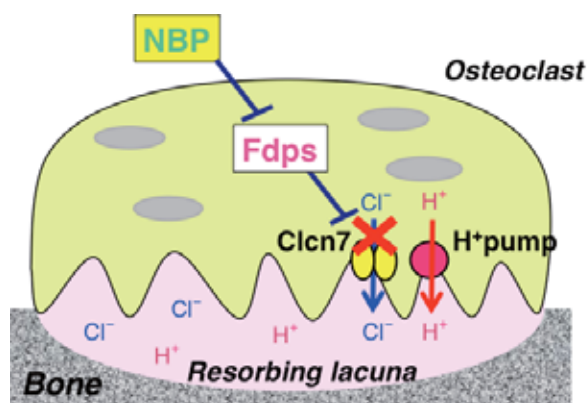


図 7 NBP は Fdps 抑制を介して酸分泌 Cl⁻ 輸送 (Clcn7) を抑制する

【課題 2】 RANKL 刺激した破骨細胞では、TRPV2 だけでなく TRPM7 の発現が優位に上昇しており (図 8 参照)、TRPV2 の活性を抑制した条件下で陽イオン電流を誘導すると、膜の過分極によって細胞内への陽イオン輸送が穏やかに活性化され、脱分極によって細胞外への陽

イオン輸送が強く活性化された。この陽イオン輸送は RANKL 刺激後、時間依存的に増大し、TRPM7 を阻害する carvacrol や 2-aminoethoxydiphenyl borate により抑制された (図 9 参照)。また、細胞外液の pH を 5.0 以下に低下させると、細胞内への陽イオン輸送が活性化された。一方、RANKL 非刺激細胞からはこのような性質の陽イオン輸送はほとんど観察されなかった。本実験において示した陽イオン輸送は、報告されている TRPM7 の性質と一致する。従って、破骨細胞への分化過程で発現する TRPM7 は陽イオン輸送体として機能することが分った。また、pH 低下に依存した TRPM7 の活性化は、破骨細胞が形成する酸性環境下での Ca^{2+} や Mg^{2+} 等の細胞内輸送やこれに

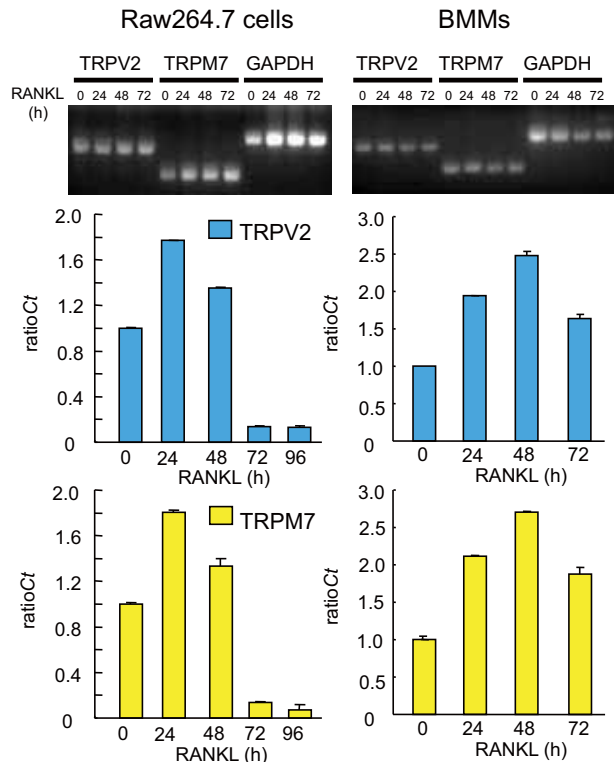


図 8 破骨細胞における TRPM7 の RANKL 依存性発現上昇

起因した機能調節に適した性質と考えられた。本研究から TRPV2 だけでなく TRPM7 という TRP 分子も RANKL 依存性に発現が優位に上昇することが明らかとなった。TRPM7 は Ca^{2+} よりも Mg^{2+} を主として輸送するユニークな分子であり、今後は TRPM7 分子のコンディショナル KO マウスの作成にも取り組み、その機能解析も

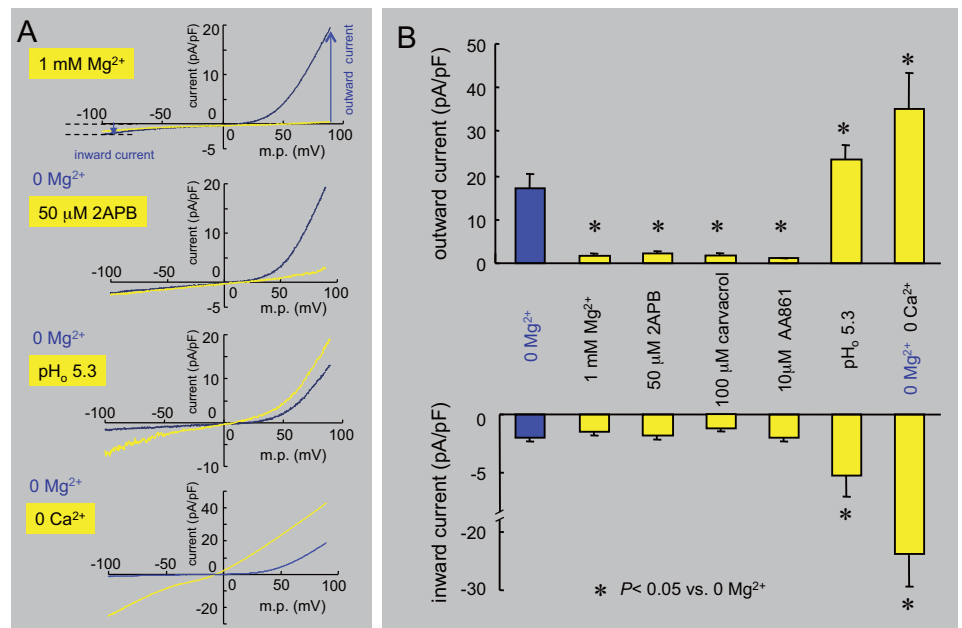


図 9 酸で活性化される TRPM7 様イオン電流とその薬理的性質

進めていく予定である。以上の研究より、破骨前駆細胞に発現する TRP 分子というミネラル輸送体の機能や役割が明らかとなってきた。従って、これら機能分子と破骨細胞の骨吸収機能の関連を解明することは、歯周病やリュウマチ等における病的骨吸収を制御するために有用なアイデアを提供し、破骨細胞 TRP 分子をターゲットとした特異的かつ簡便な制御によって異常骨吸収に対する新しい薬剤や治療法の開発への展開が期待され、社会的に

も大変意義があると考えられる。

【課題3】野生型マウスを In situ hybridization 法、組織免疫染色法や Western Blotting 法により解析した結果、全身の中で TRPM7 は象牙芽細胞とエナメル芽細胞に特に強く発現しており（図10参照）、TRPM7 の発現バランスは、歯の発生課程や歯牙の部位によって変化していることが分かった。また、株化細胞より誘導した野生型の象牙芽細胞やエナメル芽

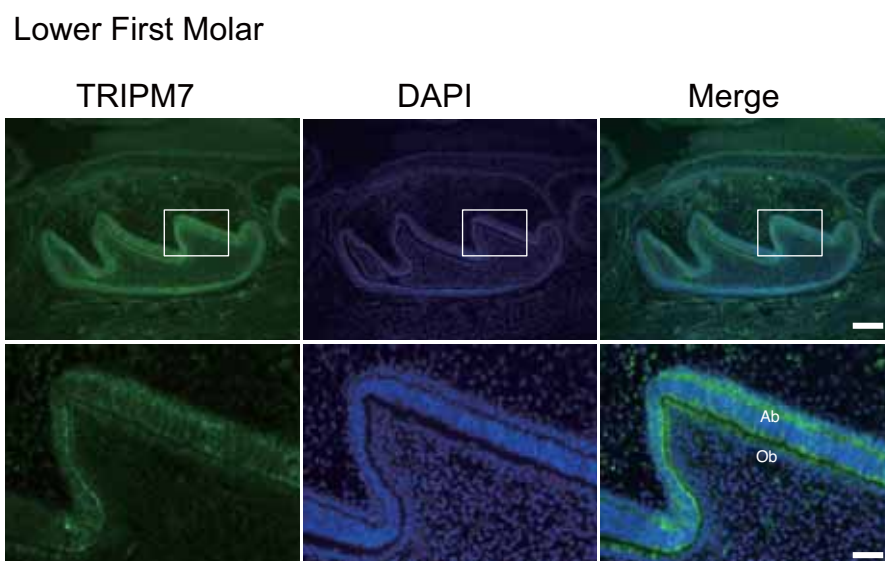


図10 歯牙に強く発現する TRPM7 分子（マウス下顎大臼歯部）

細胞を用いた実験で、TRPM7 の発現を shRNA でサイレンシングすると歯の石灰化における Ca イオンの析出が抑制されることより、歯の石灰化調節機構に関わることが示唆された。さらに TRPM7 の高発現や TRPM7 を介するイオン輸送の存在も確認でき、TRPM7 分子が高発現しイオン輸送体として機能していることも明らかとなった。一方、全身的な TRPM7 遺伝子欠損マウスは胎生致死で in vivo 解析できないため、今後は歯牙形成や石灰化過程における TRPM7 のイオン輸送自体の役割を in vivo 実験系で解明するために、我々が作成した TRPM7-fllox マウスを再調整し、これを用いて象牙芽細胞及びエナメル芽細胞に特異的なタンパク Cre マウスの交配により、象牙芽細胞及びエナメル芽細胞に特異的な TRPM7 コンディショナル欠損マウスを現在作製中である。また、TRPM7 キナーゼ変異マウス（キナーゼ機能欠型）を共同研究者から入手し歯牙を解析する予定である。これらの取組みは、歯牙の石灰化調節や石灰化維持機構の解明に繋がり、歯牙石灰化障害の病態解明や歯牙硬組織の再生研究へ新しい指針を提供すると考えられる。

発表論文

1. SCF β -TRCP regulates osteoclastogenesis via promoting CYLD ubiquitination.
Wu X, Fukushima H, North BJ, Nagaoka Y, Nagashima K, Deng F, Okabe K, Inuzuka H, Wei W. Oncotarget. 査読有、30, 4211-21 (2014)

2. The potential role of transient receptor potential type A1 as a mechanoreceptor in human periodontal ligament cells. Tsutsumi T, Kajiya H, Fukawa T, Sasaki M, Nemoto T, Tsuzuki T, Takahashi Y, Fujii S, Maeda H, Okabe K.
Eur J Oral Sci. 査読有、121, 538-44 (2013)
3. A novel inhibitory mechanism of nitrogen-containing bisphosphonate on the activity of Cl⁻ extrusion in osteoclasts. Ohgi K, Kajiya H, Okamoto F, Nagaoka Y, Onitsuka T, Nagai A, Sakagami R, Okabe K.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 査読有、386, 589-98 (2013)
4. Hyperocclusion up-regulates CCL3 expression in CCL2⁻ and CCR2-deficient mice. Tsutsumi T, Kajiya H, Goto KT, Takahashi Y, Okabe K.
J Dent Res. 査読有、92, 65-70 (2013)
5. Reactive oxygen species stimulates epithelial mesenchymal transition in normal human epidermal keratinocytes via TGF-beta secretion. Fukawa T, Kajiya H, Ozeki S, Ikebe T, Okabe K. Exp Cell Res. 査読有、10, 1926-32 (2012)
6. Odontoclasts and calcitonin
Okabe K, Okamoto F, Kajiya H. Clin Calcium. 22, 19-26 (2012)
7. Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass. Masuyama R, Mizuno A, Komori H, Kajiya H, Uekawa A, Kitaura H, Okabe K, Ohyama K, Komori T.
J Bone Miner Res. 査読有、27, 1708-21 (2012)

学会発表

1. ユビキチンリガーゼ SCF/β-TRCP は、脱ユビキチン化酵素 CYLD の量的制御を介して破骨細胞分化を促進する。福島秀文、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、自見英治郎、岡部幸司。第32回日本骨代謝学会、大阪、2014年7月。
2. メカニカルストレスによる歯根膜組織のコラーゲン産生能の加齢による変化。都築尊、鍛冶屋 浩、後藤加寿子、堤 貴司、岡部幸司。第32回日本骨代謝学会、大阪、

2014年7月.

3. 窒素含有ビスホスホネート製剤(NBP)による破骨細胞の融合阻害を介する分化阻害作用. 長岡良礼、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、福島秀文、岡部幸司. 第32回日本骨代謝学会、大阪、2014年7月.
4. 細胞周期におけるSCF/ β -TRCPによるCdh1の量的制御機構. 福島秀文、犬塚博之、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、岡部幸司. 第91回日本生理学会、鹿児島、2014年3月.
5. 象牙芽細胞におけるTRPM7の発現解析. 片桐千秋、圓谷智之、岡本富士雄、岡部幸司、松下正之. 第91回日本生理学会、鹿児島、2014年3月.
6. ファーネシル合成酵素による破骨細胞Cl⁻輸送体調節. 鍛冶屋 浩、大城希美子、岡本富士雄、岡部幸司. 第91回日本生理学会、鹿児島、2014年3月.
7. Expression of C-C chemokine ligands for osteoclastogenesis induced by hyperocclusion. Tsutsumi T, Kajiya H, Goto K, Takahashi Y, Okabe K. アメリカ骨代謝学会・2013年学術集会、ボルチモア、2013年10月.
8. A novel role of farnesyl diphosphate synthetase (FDPS) on the activity of Cl⁻ extrusion in osteoclasts. Kajiya H, Tsutsumi T, Nagaoka Y, Goto K, Fukawa T, Sasaki M, Okamoto F, Okabe K. アメリカ骨代謝学会・2013年学術集会、ボルチモア、2013年10月.
9. Notch2のHadju-Cheney症候群型変異はSCF/FBW7によるタンパクの量的制御を免れる. 福島秀文、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、自見英治郎、岡部幸司. 第64回西日本生理学会、北九州、2013年10月.
10. 窒素含有ビスホスホネート製剤(NBP)による破骨細胞の細胞融合阻害作用. 長岡良礼、鍛冶屋 浩、佐々木三奈、永沼香織、堤 貴司、府川晃久、岡本富士雄、岡部幸司. 第55回歯科基礎医学会、岡山、2013年9月.
11. The novel roles of CCL2 and CCL3 on osteoclast differentiation and alveolar bone resorption during occlusal traumatism. Tsutsumi T, Kajiya H, Goto K, Nagaoka Y, Okamoto F, Okabe K. 国際骨代謝学会(IBMS)・日本骨代謝学会(JSBMR)第2回合同

国際会議、神戸、2013年5月.

12. The properties of Mg^{2+} -inhibited TRPM7-like channel in mouse osteoclasts. Okamoto F, Kajiya H, Okabe K. 第90回日本生理学会、東京、2013年3月.
13. 咬合性外傷時の破骨細胞誘導における C-C ケモカインの役割. 堤 貴司、鍛冶屋 浩、都築 尊、根本哲臣、高橋 裕、岡部幸司 第39回福岡歯科大学学会総会、福岡、2012年12月.
14. 窒素含有ビスホスホネート製剤 (NBP) による破骨細胞形成阻害とプレニル化促進物質による回復. 長岡良礼、鍛冶屋 浩、府川晃久、佐々木三奈、来海慶一郎、山下善弘、大関 悟、池邊哲郎、岡本富士雄、岡部幸司 第39回福岡歯科大学学会総会、福岡、2012年12月.
15. CCL2 シグナル欠損が過剰咬合力誘発性の歯槽骨吸収に及ぼす影響. 堤 貴司、鍛冶屋 浩、高橋 裕、岡部幸司 第55回歯科基礎医学会、郡山、2012年9月.
16. 窒素含有ビスフォスフォネート (NBPs) は破骨細胞の Clcn7 を介して Cl 輸送を抑制する. 大城希美子、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、堤 貴司、長岡良礼、佐々木三奈、坂上竜資、岡部幸司 第6回トランスポーター研究会九州部会、福岡、2012年9月.
17. 破骨細胞の Clc7 型 Cl 輸送体 (Clcn7) はファーンシル 2 リン酸合成酵素 (Fdps) により活性化され、阻害剤ゾレンドロ酸はこの Cl 分泌能を抑制する. 鍛冶屋 浩、大城希美子、岡本富士雄、岡部幸司 第30回日本骨代謝学会、東京、2012年7月.
18. CCL2 シグナル欠損した咬合性外傷モデルマウスを用いた顎骨吸収時のケモカインの動態解析. 堤 貴司、鍛冶屋 浩、後藤加寿子、岡部幸司 第30回日本骨代謝学会、東京、2012年7月.
19. 破骨細胞から誘導される TRPM7 様陽イオン電流とその酸依存的活性化. 岡本富士雄、鍛冶屋 浩、岡部幸司 第8回 TRP チャネル研究会、岡崎、2012年6月.
20. Regulation of osteoclastogenesis through calcium oscillations. Okabe K, Kajiya H, Okamoto F, Tsusumi T. 第89回日本生理学会シンポジウム 6、松本、2012年3月.

21. Cl⁻ transporters as novel therapeutic targets for abnormal osteoclastic bone resorption. Okabe K, Okamoto F, Kajiya H, Ohgi K. 第 89 回日本生理学会シンポジウム 27、松本、2012 年 3 月.
22. Bisphosphonate as a novel target to the Clcn7 Cl⁻ transporter in osteoclasts. Ohgi K, Kajiya H, Okamoto F, Tsusumi T, Onitsuka T, Nagai A, Sakagami R, Okabe K. 第 89 回日本生理学会、松本、2012 年 3 月.

研究課題	腫瘍の転移と内皮細胞の応答
研究代表者	沢 禎彦（生体構造学講座・機能構造学分野・教授）

要約

本研究では、抗マウスポドプラニン抗体（PMab-1）ならびに抗ヒトポドプラニン抗体（NZ-1.2）を開発した（MBL, Millipore などで販売）。口腔癌の検索ではリンパ管で腫瘍接着部位に血小板が介在することが明らかとなり、血小板が口腔扁平上皮癌のリンパ行性転移に関与する可能性が示唆された。ポドプラニン発現性口腔癌細胞のリンパ管内皮細胞に対する接着はポドプラニン非発現細胞より強く、接着は NZ-1.2 によって阻害され、ポドプラニン抗体が転移の阻止に有用である可能性が示された。

研究目的

1. 研究開始当初の背景

1) リンパ管内皮細胞における免疫機能分子の発現について

申請者はこれまで、リンパ管が toll-like receptor で細菌成分を認識し白血球接着因子と貪食細胞特異的ケモカインを発現することによりリンパ節求心性の免疫学的応答を促進する可能性を示した。

2) ポドプラニンの分子生物学的解析

共同研究者の加藤は、膠芽腫や肺扁平上皮癌が発現するムチン型蛋白ポドプラニンの分子構造を明らかにし、血小板と結合することを示した。

2. 研究の目的

ポドプラニンは口腔扁平上皮癌の浸潤領域に強く発現し、リンパ節転移に相関する。本研究では、扁平上皮癌が血小板を介してリンパ管内皮細胞に結合する可能性、ポドプラニンが扁平上皮癌の内皮細胞への接着を促進させる可能性、ポドプラニンが腫瘍細胞に癌幹細胞形質を誘導する可能性を検討した。

方法

1. 扁平上皮癌のリンパ管内皮細胞への CELC2-PLAG 複合体を介した接着の解明

1) 市販の口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 にポドプラニン遺伝子を導入した HSC3-PDPN を用いた。

2) マトリゲルにて培養したヒトリンパ管内皮細胞に対する HSC3-PDPN の浸潤試験とポドプラニン遺伝子特異抗体による接着阻害試験を行った。

3) マウスポドプラニン遺伝子により作製したトランスジェニックマウス頬粘膜下にポドプラニンを強く発現するマウスメラノーマ B16-F10 を移植、組織切片を作製し、リンパ管と移植細胞を二重免疫染色した。

2. リンパ管内皮細胞に CELC2-PLAG を介して接着した腫瘍細胞の癌性形質発現の解析

ヒトリンパ管内皮細胞と HSC3-PDPN を共培養し増殖・浸潤能を検討した。HSC3-PDPN をヌードマウス頬粘膜下に移植、肺転移細胞を分離培養し、癌形質発現を分析した。

結果と考察

1) ポドプラニンを介した接着

HSC3-PDPN は接着と浸潤が HSC3 より有意に増大し、ポドプラニン特異抗体によって阻害された（投稿準備中）。

2) ポドプラニン依存性リンパ行性転移

ヌードマウス頬粘膜下に移植した HSC3-PDPN について、我々が新しく開発した抗ヒトポドプラニン抗体による肺転移阻止効果が見られた（投稿準備中）。

3) リンパ節転移した移植細胞の podoplanin 依存性癌性形質発現の解析

ヌードマウスの頬粘膜下に移植し、顎下リンパ節を摘出して移植細胞を分離培養した結果、増殖・浸潤能、また MMP1 と MMP3 の産生が飛躍的に増大することが明らかとなり、ポドプラニン発現細胞は基底膜分解を促進させることで転移能が高くなる可能性が考えられた。

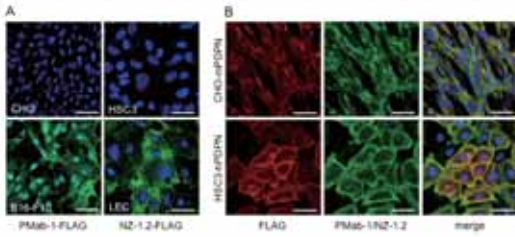
4) 健常個体の頭頸部正常組織における podoplanin の発現

抗 podoplanin 抗体による治療を考えた時に、健常個体における podoplanin 発現組織を精査する必要がある。ヒトとマウスの組織検索の結果、唾液腺筋上皮、歯胚上皮と象牙質形成期の象牙芽細胞、神経周皮細胞および脈絡叢上皮と軟膜における podoplanin 発現が新たに見出された。

5) 新規抗 podoplanin 抗体の開発

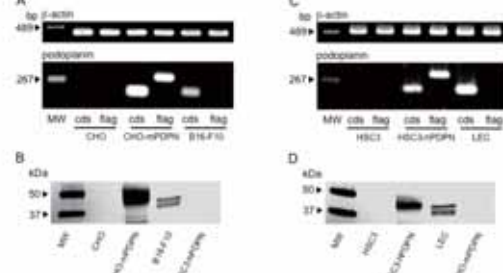
マウスとヒト podoplanin の血小板結合性 PLAG 領域を特異的に認識する新しい抗体を開発した：①ラット抗マウスポドプラニン抗体 (PMab-1)、②ラット抗ヒトポドプラニン抗体 (NZ-1.2)、PCT/JP2010/067141) (MBL, Imgenex, Sigma, Millipore で販売)。

ラット抗マウス podoplanin 抗体 PMab-1 と抗ヒト podoplanin 抗体 NZ-1.2 の反応



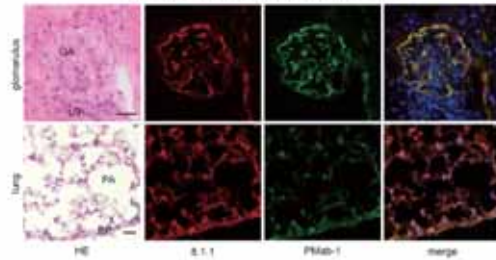
A) PMab-1 は podoplanin 陰性の CHO に反応しないが、内因性に発現する マウスメラノーマ B16-F10 とは反応した。また NZ-1.2 は podoplanin 陰性のヒト膀胱がん細胞株 HSC3 に反応しないが、内因性に発現するリンパ管内皮細胞 LEC とは反応した。
B) FLAG-podoplanin 遺伝子導入 CHO と HSC3 はすべて FLAG と podoplanin が陽性となった。Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

ラット抗マウス podoplanin 抗体 PMab-1 と抗ヒト podoplanin 抗体 NZ-1.2 の反応



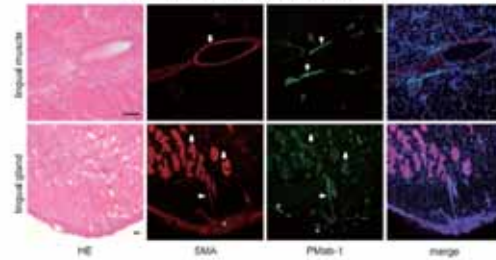
A, B) PMab-1 は podoplanin 陰性の CHO に反応しないが、FLAG-podoplanin 遺伝子導入 CHO、および内因性に発現する マウスメラノーマ B16-F10 とは反応した。
C, D) NZ-1.2 は podoplanin 陰性のヒト膀胱がん細胞株 HSC3 に反応しないが、FLAG-podoplanin 遺伝子導入 HSC3 と内因性に発現するリンパ管内皮細胞 LEC とは反応した。Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

ラット抗マウス podoplanin 抗体 PMab-1 の反応



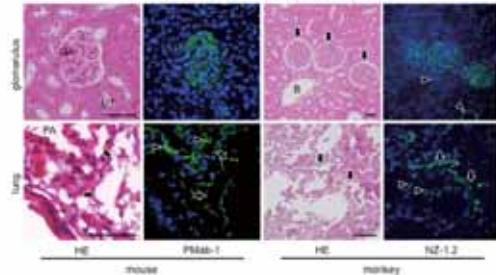
PMab-1 はマウス腎糸球体と肺動脈に反応した。
Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

ラット抗マウス podoplanin 抗体 PMab-1 の反応



PMab-1 はマウスリンパ管と唾液腺筋上皮に反応した。
Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

ラット抗ヒト podoplanin 抗体 NZ-1.2 の反応



NZ-1.2 は免疫原の FLAG 含有ペプチドのアミノ酸配列が同じであるサルにおいて、腎糸球体と肺動脈・リンパ管に反応した。
Kaji et al, Acta Histochem Cytochem, 2012

Products Wako

脳腫瘍細胞マーカー抗体
抗ヒトポドoplanin、モノクローナル抗体
抗マウスポドoplanin、モノクローナル抗体

ポドoplaninは、Aggrecan, gp48, T1αなどとしても知られ、さまざまな作用が報告されている1型膜貫通型トランスメンタン。癌転移に関与する細胞には癌細胞増殖性に関与するFLAGドメインを持ちます。ポドoplaninは血管内皮細胞には発現せずリンパ管内皮細胞に発現しているためリンパ管のマーカーとして注目されています。さまざまな腫瘍で発現が亢進され、腫瘍マーカーとしても利用が期待されています。脳腫瘍においては血管壁に定着してポドoplaninの発現が亢進することが報告されています。
 *本品は、ポドoplaninのFLAG領域を認識する抗体で、腫瘍マーカーとしてのマーカーとしてポドoplaninを発見する癌細胞に使用することができます。

※数量：PMab-1, 0.05%アブソリュート
 ※抗原調製：Imagifit

【参考文献】
 1) Kaji C, et al. Acta Histochem Cytochem, 2012

発表論文

1. Kaji C, Kato Y, Sawa Y. The expression of podoplanin and classic cadherins in the mouse brain. J Anat 2012;220:435-446.
2. Yamanouchi K, Tsuruga E, Oka K, Sawa Y, Fibrillin-1 and fibrillin-2 are essential for formation of thick oxytalan fibers in human nonpigmented ciliary epithelial cells in vitro. Connect Tissue Res 2012;53:14-20.
3. Nakatomi Y, Tsuruga E, Sawa Y, Intracellular interaction of EMILIN-1 with fibrillin-1 in human

periodontal ligament cells. *Orthodontic Waves* 2012;71:66-69.

4. Tsuruga E, Oka K, Hatakeyama Y, Sawa Y. Latent transforming growth factor- β binding protein 2 negatively regulates coalescence of oxytalan fibers induced by stretching stress. *Connect Tissue Res* 2012;53:521-527.
5. Kaji C, Tsujimoto Y, Kaneko, MK, Kato Y and Sawa Y. Immunohistochemical examination of novel rat monoclonal antibodies against mouse and human podoplanin. *Acta Histochem Cytochem* 2012;45:227-237.
6. Kaneko MK, Sawa Y, Kato Y. A chimeric anti-podoplanin antibody suppresses tumor metastasis via neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Sci* 2012;103: 1913-1919.
7. Oka K, Tsuruga T, Hatakeyama Y, Sawa Y. Roles of collagen and periostin expression by cranial neural crest cells during soft palate development. *J Histochem Cytochem* 2012;60:57-68.
8. Oka K, Sawa Y, Cellular turnover in epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament of the mouse molar. *Eur J Oral Sci* 2012;120:484-494.
9. Nishimura S, Sawa Y. Risk factors to cause tooth formation anomalies in chemotherapy of paediatric cancers. *Eur J Cancer Care*, 2013;22:353-360.
10. Takata S, Sawa Y, Expression of Toll-Like Receptor 4 in Glomerular Endothelial Cells under Diabetic Conditions. *Acta Histochem Cytochem* 2013;46:35-42.
11. Uchiyama , Sawa Y. Altered dynamics in the renal lymphatic circulation of type 1 and type 2 diabetic mice. *Acta Histochem Cytochem* 2013;46:97-104.
12. Sawa Y, Takata S, Hatakeyama Y, Ishikawa H, Tsuruga E. Expression of toll-like receptor 2 in glomerular endothelial cells and promotion of diabetic nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *PLoS One*. 2014;9:e97165.

学会発表

1. 加地千晶, 友岡みわ, 小島寛, 沢禎彦:マウス脈絡叢におけるポドプラニンとカドヘリンの発現. 第 37 回日本微小循環学会総会. 盛岡. 2012, 3
2. 畠山雄次, 畠山純子, 岡曉子, 敦賀英知, 稲井哲一朗, 沢禎彦:成長板軟骨におけるアメロジェニンおよび LAMP-1 の免疫組織学的研究. 第 44 回日本結合組織学会. 東京. 2012, 6
3. 畠山雄次, 畠山純子, 岡曉子, 敦賀英知, 稲井哲一朗, 沢禎彦:歯根膜形成における Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1)の免疫組織化学的局在について第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 郡山. 2012, 9
4. 山内由宣, 中富佑香, 中島一記, 敦賀英知, 沢禎彦, 石川博之:Fibulin-4 は LOXL-2/エラスチン複

- 合体形成を調節する. 第 44 回日本結合組織学会. 東京. 2012, 6
5. 山之内香, 川越慈, 中富佑香, 中島一記, 敦賀 英知, 沢禎彦, 石川博之:毛様体形成において Fibrillin-1 と Fibrillin-2 は必須である. 第 44 回日本結合組織学会. 東京. 2012,
 6. 中富佑香, 敦賀英知, 山内由宣, 中島一記, 沢禎彦, 石川博之:EMILIN-1 は Fibrillin-1 と細胞内で結合してオキシタラン線維の形成量を調節している. 第 44 回日本結合組織学会. 東京. 2012, 6
 7. 西村紗和, 稲田浩子, 沢禎彦, 石川博之:小児癌の抗癌剤治療が引き起こす永久歯の形成障害について. 第 39 回福岡歯科大学学会総会. 福岡. 2012, 12 加地千晶, 友岡みわ, 畠山雄次, 敦賀英知, 小島寛, 沢禎彦:正常マウスグリア細胞が発現するポドプラリンとカドヘリン. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 高松. 2013, 3
 8. 高田俊輔, 内山貴誠, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦:糖尿病環境下の腎系球体における TLR2 と TLR4 の発現について. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 高松. 2013, 3
 9. 内山貴誠, 高田俊輔, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦:糖尿病モデルマウスの腎リンパ管増生について. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 高松. 2013, 3
 10. 高田俊輔, 内山貴誠, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦:Expression of toll-like receptors in glomerular endothelial cells under diabetic conditions. 第 38 回日本微小循環学会総会. 東京. 2013, 2
 11. 高田俊輔, 内山貴誠, 石川博之, 沢禎彦:糖尿病モデルマウス腎系球体における TLR2 と TLR4 の発現. 第 28 回日本糖尿病合併症学会. 旭川. 2013, 9
 12. 内山貴誠, 高田俊輔, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦: I 型と II 型糖尿病モデルマウスにおける腎リンパ管新生. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 岡山. 2013, 9
 13. 高田俊輔, 内山貴誠, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦:糖尿病環境下の腎系球体内皮細胞における TLR2 と TLR4 の発現. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 岡山. 2013, 9
 14. 内山貴誠, 高田俊輔, 石川博之, 沢禎彦: I 型と II 型糖尿病マウスにおける腎リンパ管増生について. 第 51 回日本糖尿病学会九州地方会. 沖縄. 2013, 11
 15. 高田俊輔, 内山貴誠, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦:糖尿病環境下の腎系球体における Toll-like receptor (TLR) 2 と 4 の発現. 第 51 回日本糖尿病学会九州地方会. 沖縄. 2013, 11
 16. 内山貴誠, 高田俊輔, 石川博之, 沢禎彦: I 型と II 型糖尿病モデルマウスにおける腎リンパ管新生について. 第 40 回福岡歯科大学学会総会. 福岡. 2013. 12
 17. 高田俊輔, 内山貴誠, 石川博之, 沢禎彦:糖尿病モデルマウスの腎系球体における TLR2 と TLR4 の発現. 第 40 回福岡歯科大学学会総会. 福岡. 2013. 12
 18. 川越慈, 山之内香, 中富佑香, 中島一記, 敦賀英知, 沢禎彦, 石川博之. ヒト歯根膜線維芽細胞によるオキシタラン線維の分解過程. 第 8 回九州矯正歯科学会学術大会. 小倉. 2013, 2
 19. 山之内香, 敦賀英知, 沢禎彦, 石川博之. 歯根膜オキシタラン線維形成における MAGP-1 の機能. 第 56 回春季日本歯周病学会学術大会. 東京. 2013, 5

20. 川越慈、敦賀英知、沢禎彦、石川博之. ヒト歯根膜オキシタラン線維の分解機構. 第 56 回春季日本歯周病学会学術大会. 東京. 2013, 5
21. 藤田隆寛、山之内香、中富佑香、中島一記、敦賀英知、沢禎彦、石川博之. オキシタラン線維の形成機構における MAGP-1 の機能解析. 第 72 回日本矯正歯科学会大会. 長野. 2013, 10
22. 川越 慈、山之内香、中富佑香、中島一記、敦賀英知、沢禎彦、石川博之. ヒト歯根膜オキシタラン線維の改造機構. 第 72 回日本矯正歯科学会大会. 長野. 2013, 10
23. 山之内香、川越慈、中富佑香、中島一記、敦賀英知、沢禎彦、石川博之. ヒト無色素毛様体上皮細胞によるオキシタラン線維形成の解析. 日本解剖学会第 69 回九州支部学術集会. 鹿児島. 2013, 11
24. 西村 紗和、沢 禎彦、稲田 浩子、上田 耕一郎、石川 博之、水田 祥代. 小児がん治療後の歯科的長期フォローアップ. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム. 福岡. 2013, 12
25. 高田俊輔、梶原弘一郎、沢 禎彦、石川博之. 糖尿病マウス腎糸球体における歯周病原菌由来 LPS による TLR2/4 依存性サイトカイン発現. 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会. 千葉. 2014, 5
26. 高田俊輔、梶原弘一郎、沢 禎彦、石川博之. **Severe Periodontal Disease exacerbate Diabetic Nephropathy through Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4.** 第 57 回春季日本歯周病学会学術集会. 岐阜. 2014, 5
27. Kaji, C., Tomooka, M., Kojima, H. and Sawa, Y. Distribution of Podoplanin Expressing Cells in the Oral Tissue. J. Dent. Res. 90(S) 90th Interbational Association of Dental Research, Iguazu Falls, 2012, 7
28. Tomooka, M., Kaji, C., Kojima, H., Sawa, Y.: Podoplanin expression on the peripheral nerves and central nervous system. The 60th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. Niigata. 2012, 12
29. Uchiyama, T., Kojima, H., Ishikawa, H., Sawa, Y.: Immunohistochemistry for oral tissue by a novel antibody to podoplanin. The 60th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. Niigata. 2012, 12
30. Sawa Y, Takata S, Ishikawa H, Hatakeyama Y, Tsuruga E. Promotion of nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in diabetic kidney. J. Dent. Res. 92(S). 92th International Association of Dental Research, Cape Town, 2014, 6

研究課題	脳血管障害と免疫・酸化ストレス
研究代表者	大星 博明（総合医学講座・内科学分野・教授）

要約

脳虚血発症後に脳血流以外の因子が脳梗塞を増悪させることが示唆されている。我々は最近、脳梗塞増悪過程におけるインターロイキン(IL) 23-17 axis の重要性を明らかにしており、本研究は、さらに脳梗塞における免疫応答や血液脳関門破綻等の炎症反応の機構解明を目的としている。特に、脳虚血早期における自然免疫機構の役割についての解明を試み、Toll 様受容体 TLR2 と TLR4 およびその下流シグナル MyD88 が IL23 の産生に寄与することを明らかにした。また、傷害脳組織から放出されて TLR2/4 を刺激する物質が、従来抗酸化物質と認識されてきた peroxiredoxin family であり、新規の damage-associated molecular patterns (DAMPs) として、脳虚血後の炎症惹起物質として働くことを明らかとした。さらに脳梗塞の innate immunity におけるミクログリア・マクロファージの役割および pericyte の血液脳関門での役割について解析を行っている。

研究目的

脳血管障害は、我が国の主要死因であるのみならず、寝たきりや要介護となる第1位の原因であり、国民病として高齢化社会を迎えてますます臨床的な重要性を増している。しかしながら、その後遺症を軽減する画期的な治療法は未だ開発されていない。脳血管障害の7割を占めている脳梗塞は、急性期に拡大・増悪し、時に致死的状态をもたらすが、近年急性期脳梗塞における分子機構・シグナル伝達が徐々に明らかになり、脳虚血発症後に脳血流以外の因子が脳梗塞を拡大・増悪させることが示唆されている。また、脳梗塞における免疫応答の役割が注目されてきているが、我々は最近、脳梗塞増悪過程におけるインターロイキン 23-17 axis の重要性を明らかにしている(Nat Med 2009)。本研究は、遺伝子改変動物ならびに in vivo 遺伝子導入法等を用い、脳梗塞における免疫応答や血液脳関門破綻等の炎症反応の機構を解明し、新たな治療標的を探究することを目的としている。

方法

これまでの研究で、脳梗塞の増悪機構における免疫応答、特に IL23-IL17 axis の活性化をもたらす炎症シグナルを検討してきた。すなわち、初期免疫応答に関連するシグナルの遺伝子改変動物を用い、脳虚血早期の段階における自然免疫機構の役割を探求してきた。本研究では特に Toll 様受容体(TLR)やその下流シグナルの遺伝子改変動物とその免疫担当細胞を用い、IL-23 の発現誘導をもたらす刺激について検討した。脳虚血の作製には、栓

糸閉塞モデルを用い、脳血流量などの生理学的パラメーターを測定し、再現性に優れた脳虚血を作製した。治療効果を判定するために、組織傷害のみならず、神経機能への影響も評価した。

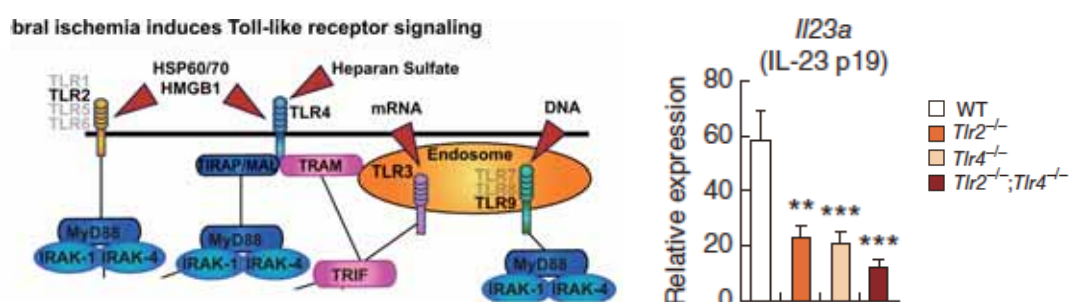
近年、種々の炎症性疾患での重要性が注目されている IL-17 であるが、我々は IL-17 を産生する細胞が虚血脳で増加し、その浸潤には IL-23 の刺激が必要であること、IL-17 産生細胞が当初想定された CD4 陽性 Th17 細胞ではなく、 $\gamma\delta$ T 細胞であること、しかも、その浸潤が脳虚血後 3 日をピークとすること、さらに、脳虚血導入 1 日後からの治療開始による IL-17 の抑制であっても脳梗塞を縮小できることを報告している (Nat Med 2009)。本研究では、この IL-17 の発現をもたらす上流シグナルを解明するために、遺伝子改変動物を用い、FACS 解析などを駆使して検討を行った。また、培養樹状細胞を用いた刺激実験による解析も行った。

結果と考察

TLR2/4 の脳梗塞増悪への影響

TLR2 よび TLR4 の遺伝子欠損マウスでは、脳虚血による組織障害および神経学的異常が野生型と比較して有意に軽減していた。これら遺伝子改変マウスの虚血脳に浸潤した炎症細胞での炎症性サイトカインの発現を検討すると、IL-23 の産生は TLR2 および TLR4 のノックアウトマウスでは著明に低下していた (図 1)。

図 1 虚血脳の炎症細胞での IL-23 誘導は TLR2/4 に依存する



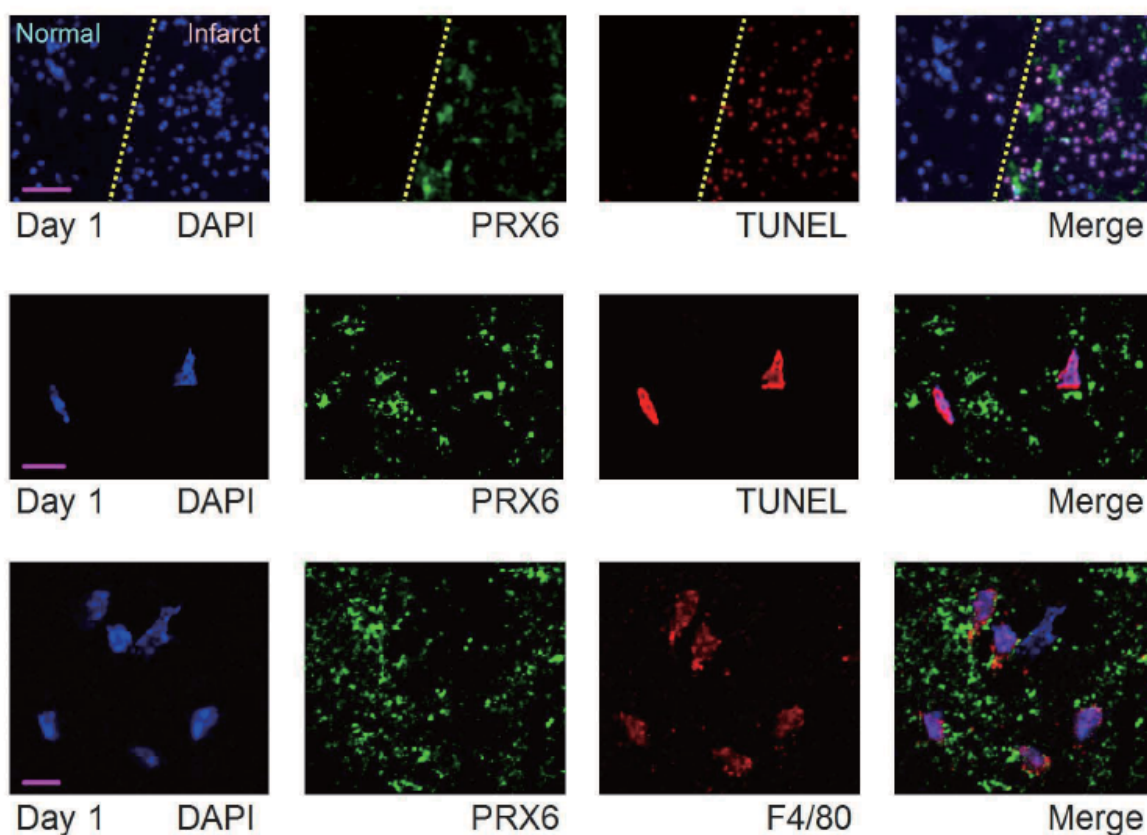
新規 DAMPs の同定

遺伝子改変マウスの骨髄由来樹状細胞を用いて虚血脳の抽出液で刺激すると、IL-23 産生を誘導できること、脳抽出液を熱処理や蛋白分解酵素処理することで誘導の活性は消失することなどから、15~25kDa のタンパクが活性化物質であることが判明した。さらに質量分析による解析などによって、IL-23 を誘導する物質が、抗酸化作用を有するタンパクとして知られるペルオキシレドキシニン (peroxiredoxin: Prx) ファミリーであることを同定した。Prx はチオレドキシニンとともに過酸化水素を中和し、以前はチオレドキシニンペルオキ

シダーゼと呼ばれており、含有量は特に脳組織で多く、細胞内に生じた活性酸素種である過酸化水素を分解することによって細胞を保護すると考えられてきた。

脳虚血発症 12 時間後の梗塞巣では Prx が強く発現誘導されるが、今回我々は新たに、脳虚血後に障害神経細胞内で発現した Prx が、細胞外に遊離すること、遊離した Prx は浸潤マクロファージに認識されること、Prx が TLR 依存性に細胞障害を引き起こすことを示し、Prx が danger signal、すなわち、damage-associated molecular patterns (DAMPs) として機能し、浸潤血液細胞の活性化により炎症を惹き起こすことを明らかにした (図 2)。

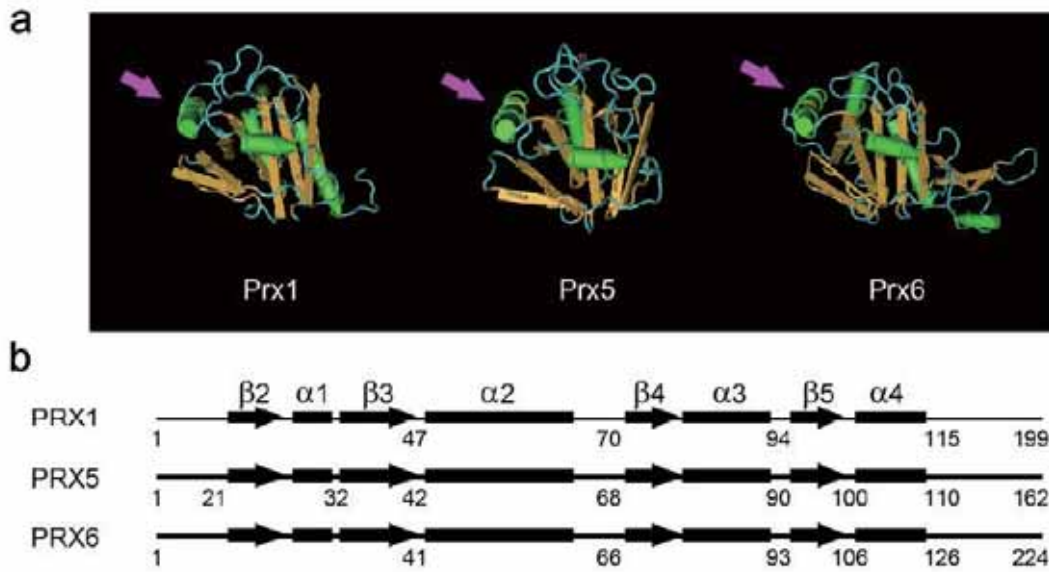
図 2 脳虚血後に傷害神経細胞(TUNEL 陽性)より放出された peroxiredoxin (Prx)はマクロファージ(F4/80)に認識される



Prx 阻害による脳梗塞治療効果

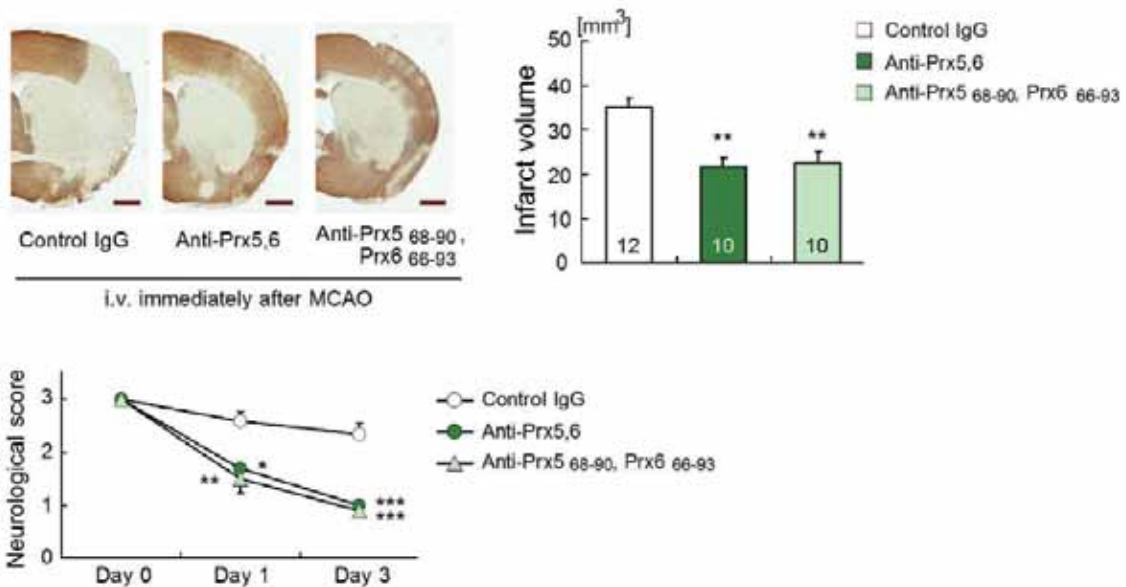
Prx ファミリーは 1 から 6 まで存在し、Prx1 と Prx2 は特に構造相同性が高い。脳抽出液の検討から Prx5 と Prx6 が最も刺激活性が高いことが認められ、Prx1, 2 も刺激していることが予想された。また、 α 3 ヘリックス部分の構造がたもたれており、同部分が IL-23 の誘導に重要であることも判明した (図 3)

図3 Peroxiredoxin family の相同性



そこでこれらの抗体を作製して治療効果を検討すると、著明な脳梗塞縮小効果が認められた (図4)。

図4 Peroxiredoxin 阻害による脳梗塞治療効果

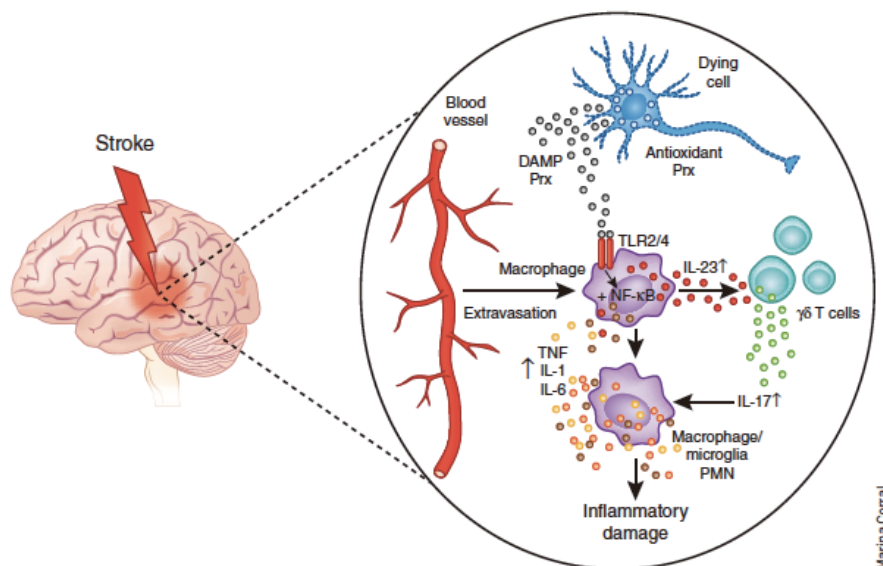


また、脳虚血後 12 時間後の投与でも Prx 抗体による脳梗塞縮小効果が認められた。

今回、脳内に浸潤したマクロファージが、虚血障害に陥った脳神経細胞から放出された Prx によって TLR 依存的に活性化され、さらなる組織傷害に寄与することを明らかにした。虚血脳に浸潤したマクロファージが産生する IL-23 は、マクロファージに遅れて脳内に浸潤する $\gamma \delta T$ 細胞に作用して IL-17 の産生を誘導することにより、亜急性期の免疫応答を

制御することをわれわれは既に明らかにしている (Nat Med 2009) が、今回の検討で、その上位シグナルとして Prx が DAMPs として作用することを明らかにした。(図 5)。

図 5 Damage-associated molecular patterns (DAMPs) としての peroxiredoxin の作用



このような炎症性免疫応答のメカニズムをさらに解明し、特異的な治療標的を明らかにすることは、脳梗塞に有力な治療法の開発に結びつくと考えられる。また、今後さらに脳梗塞の innate immunity におけるミクログリア・マクロファージの役割および pericyte の血液脳関門での役割について検討を進めていく。

発表論文

1. Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, Taniguchi M, Noguchi H, Nakano T, Masutani K, Ooboshi H, Tsuruya K, Kitazono T. Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有、306, F1418-1428 (2014)
2. Wakisaka Y, Ago T, Kamouchi M, Kuroda J, Matsuo R, Hata J, Gotoh S, Isomura T, Awano H, Suzuki K, Fukuda K, Okada Y, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T; REBIOS Investigators. Plasma S100A12 is associated with functional outcome after ischemic stroke: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke. *J Neurol Sci* 査読有、340, 75-79 (2014)
3. Kiyohara T, Kamouchi M, Kumai Y, Ninomiya T, Hata J, Yoshimura S, Ago T,

- Okada Y, Kitazono T; Fukuoka Stroke Registry Investigators (Ooboshi H). ABCD3 and ABCD3-I scores are superior to ABCD2 score in the prediction of short- and long-term risks of stroke after transient ischemic attack. *Stroke* 査読有、45, 418-425 (2014)
4. Ishitsuka K, Kamouchi M, Hata J, Fukuda K, Matsuo R, Kuroda J, Ago T, Kuwashiro T, Sugimori H, Nakane H, Kitazono T; FSR Investigators (Ooboshi H). High blood pressure after acute ischemic stroke is associated with poor clinical outcomes: Fukuoka Stroke Registry. *Hypertension* 査読有、63, 54-60 (2014)
 5. Namura S, Ooboshi H, Liu J, Yenari MA. Neuroprotection after cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 査読有、1278, 25-32 (2013)
 6. Abe K, Uchiyama S, Matsubara E, Muramatsu S, Atsuta N, Kitagawa K, Iguchi Y, Ooboshi H, Kaji R, Terao Y. IT network establishment for neuropatients. *Rinsho Shinkeigaku* 査読有、53, 1155-1158 (2013)
 7. Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem* 査読有、123S2, 29-38, (2012)
 8. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K, Yoshimura A. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med* 査読有、18, 911-917 (2012)
 9. Arimura K, Ago T, Kamouchi M, Nakamura K, Ishitsuka K, Kuroda J, Sugimori H, Ooboshi H, Sasaki T, Kitazono T. PDGF receptor β signaling in pericytes following ischemic brain injury. *Curr Neurovasc Res* 査読有、9, 1-9 (2012)
 10. Kuwashiro T, Sugimori H, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T; FSR Investigators (Ooboshi H). Risk factors predisposing to stroke recurrence within one year of non-cardioembolic stroke onset: the Fukuoka Stroke Registry. *Cerebrovasc Dis* 査読有、33, 141-149 (2012)

学会発表

1. Basic fibroblast growth factor after ischemic stroke in diabetic patients - Research for Biomarkers in Ischemic Stroke (REBIOS) - Nakamura K, Ago T, Arimura K, Makihara N, Nishimura A, Matsuo R, Kuroda J, Wakisaka Y, Isomura T, Awano H, Suzuki K, Okada Y, Kamouchi M, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T. International Stroke Conference 2014, San Diego, February 2014.
2. The expression of pericyte PDGFR β is regulated by basic FGF after ischemic stroke - Research for Biomarkers in Ischemic Stroke (REBIOS) - Nakamura K, Arimura K, Ago T, Makihara N, Isomura T, Watabe W, Awano H, Suzuki K, Kamouchi M, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T. Neuroscience Meeting 2013, San Diego, November 2013.
3. Phosphate overload induces systemic inflammation, malnutrition, and vascular calcification in uremia. Yamada S, Tokumoto M, Taniguchi M, Tsuruya K, Ooboshi H, and Kitazono T. ASN Kidney Week 2013, Atlanta, November 2013.
4. The combined therapy with calcitriol and a calcimimetic agent, R568, ameliorates phosphorus-induced calcification with altered expression of SIRT1 and ALP in human vascular smooth muscle cells. Tokumoto M, Yamada S, Fujino T, Tsuruya K, Kitazono T, Ooboshi H. ASN Kidney Week 2013, Atlanta, November 2013.
5. 脳梗塞発症後の糖尿病患者における basic FGF の上昇: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke (REBIOS). 中村晋之、吾郷哲朗、有村公一、牧原典子、栗野秀人、鈴木一夫、清原裕、鴨打正浩、大星博明、北園孝成. 日本脳循環代謝学会総会、札幌、2013年11月.
6. 脳梗塞後の S100A12 血漿濃度は昨日予後不良と挿管する: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke. 脇坂義信、吾郷哲朗、鴨打正浩、磯村哲、栗野秀人、鈴木一夫、岡田靖、清原裕、大星博明、北園孝成. 第38回日本脳卒中学会総会、東京、2013年3月.
7. Extracellular newly identified receptor for advanced glycation endproducts binding protein (EN-RAGE) predicts the outcome in patients with acute ischemic stroke: Research for Biomarkers in Ischemic Stroke. Wakisaka Y, Ago T, Kamouchi M, Kuroda J, Matsuo R, Gotoh S, Watanabe W, Isomura T, Awano H, Suzuki K,

Fukuda K, Okada Y, Kiyohara Y, Ooboshi H, Kitazono T. International Stroke Conference 2013, Honolulu, February 2013.

8. Innate immunity as a novel therapeutic target of brain infarction. Ooboshi H. Transpacific Workshop on Stroke. New Orleans, October 2012.

9. 大星博明: Immune response as a novel therapeutic target of brain infarction. 第44回日本動脈硬化学会、福岡、2012年7月.

研究課題	IL-10産生性制御性T細胞を用いた新しい眼炎症治療戦略
研究代表者	川野庸一（眼科）

要約

IL-12サイトカインファミリーに属するIL-27およびIL-35の眼炎症に及ぼす効果について、実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)を用いた解析を行った。EAUにおいては炎症後期の沈静期に向かってIL27とIL10の発現が増加していた。またrIL-27は炎症初期のTh1誘導・炎症後期のTh17抑制、IL-35は炎症初期Th1抑制・炎症各期においてTh17の抑制作用があり、両サイトカインともに眼炎症を抑制する可能性が示された。

研究目的

内因性ぶどう膜炎は自己免疫性疾患で、種々の転帰により失明に至ることもある重要な難治性眼疾患であり、小児にはまれで加齢に伴って発症してくる。特に視力予後が不良であったベーチェット病によるぶどう膜炎に対しては、近年サイトカインの1つであるTNF(腫瘍壊死因子)- α を標的とした生物製剤(インフリキシマブ)が導入されたことにより、その予後は劇的に改善した。眼炎症の制御にこのような生物製剤が有用であることが示され、今後も新たな治療のターゲットを探ることを目的として眼炎症におけるサイトカインの動きを探ることを課題とした。

IL-12関連サイトカインであるIL-23, IL-27は活性化した樹状細胞から産生され、CD4陽性T細胞の分化に深く関与することが知られる。IL-12, IL-23, IL-27はそれぞれIFN- γ を産生し細胞性免疫(Th1)の誘導に関与する。IL-23はIL-17を産生し炎症性疾患の病態形成に関与するTh17と呼ばれる細胞集団の分化を促進し、炎症誘導に関わる。

共同研究者の吉村らは、実験的自己免疫性ぶどう膜炎(Experimental autoimmune uveoretinitis, EAU)のモデルを用いて、ぶどう膜炎におけるTh17の関与について解析してきた(Rheumatology (Oxford). 2009 Apr;48(4):347-54.Int Immunol. 2008 Feb;20(2):209-14)。またIL-27は初期にはTh1を誘導する一方、IL-23により誘導されたTh17細胞のサイトカイン産生を抑制することを明らかにしてきた(J Immunol. 2006 Oct 15;177(8):5377-85)。また近年IL-27のもつ免疫抑制作用の一部は、活性化CD4陽性T細胞から産生される免疫抑制性サイトカインであるIL-10の産生が誘導されることによることが示された。これらの背景に基づき、今回我々はEAUを誘導後、炎症が発生し沈静化していく期間における経時的なIL-27、IL-10の眼内、及びリンパ節における発現の経過を解析した。また、同じIL-12関連サイトカインであり、近年その免疫抑制作用が注目されてきているIL-35に着目、EAU誘導後、経時的にリンパ球を採取しIL-27と比較する形でIL-35の役割について検討を行った。

方法

6週齢のC57BL/6マウスにInterphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP)由来ペプチドおよび Complete Freund's Adjuvant (CFA)を用いてEAUを誘導後0, 7, 14, 21日目に眼球、所属リンパ節および脾臓を摘出し磁気ビーズシステムを用いてCD4陽性T細胞を精製、抗CD3抗体およびIRBP刺激下でマイトマイシンC処理後脾細胞と共に培養した。眼内浸潤リンパ球に関してはIL-27P28とIL-10の発現をFACSおよびPCRにて検討した。リンパ節、脾細胞に関してはリコンビナントIL-27(rIL-27)およびrIL-35を添加し、IFN- γ 、IL-17産生を3日後にELISAで、7日後にFACSを用いて検討した。また転写因子の発現をPCRにて検討した。

結果と考察

EAU誘導後、経時的に採取、精製したCD4陽性T細胞において、IL-27p28およびIL-10の発現はFACSによる解析ではday21まで徐々に増加していた。(図1) PCRによる発現では同様の傾向が見られた。IL-27がIL-10を産生しEAU炎症を抑制している可能性があると考えられた。また各時期のリンパ球をin vitroでr-IL27で刺激すると、IL-10の発現は対象に比較して増加した。(図2)

図1

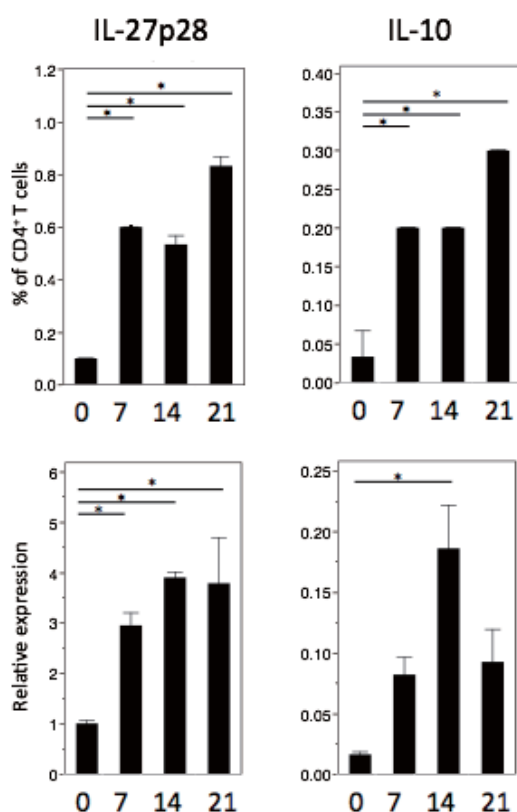
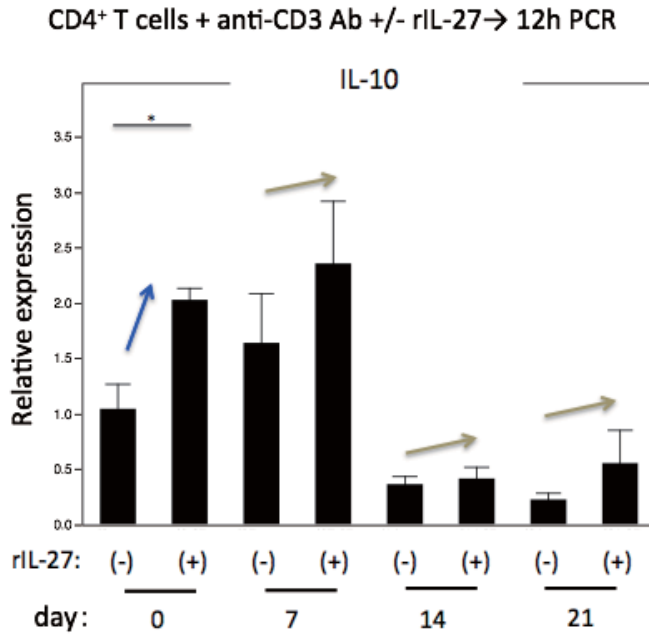


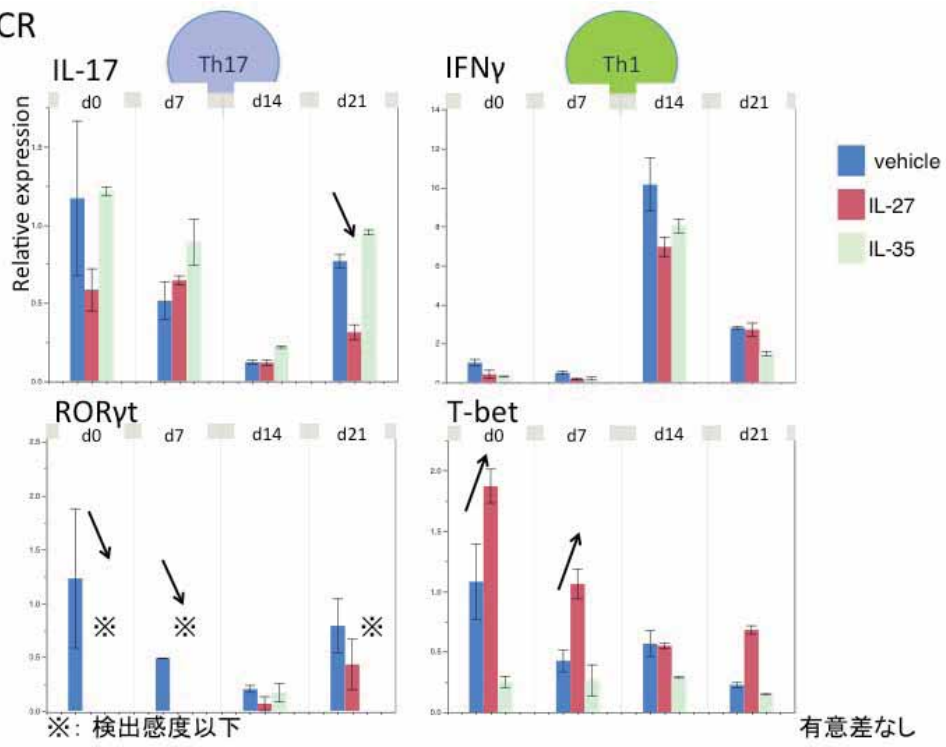
図 2

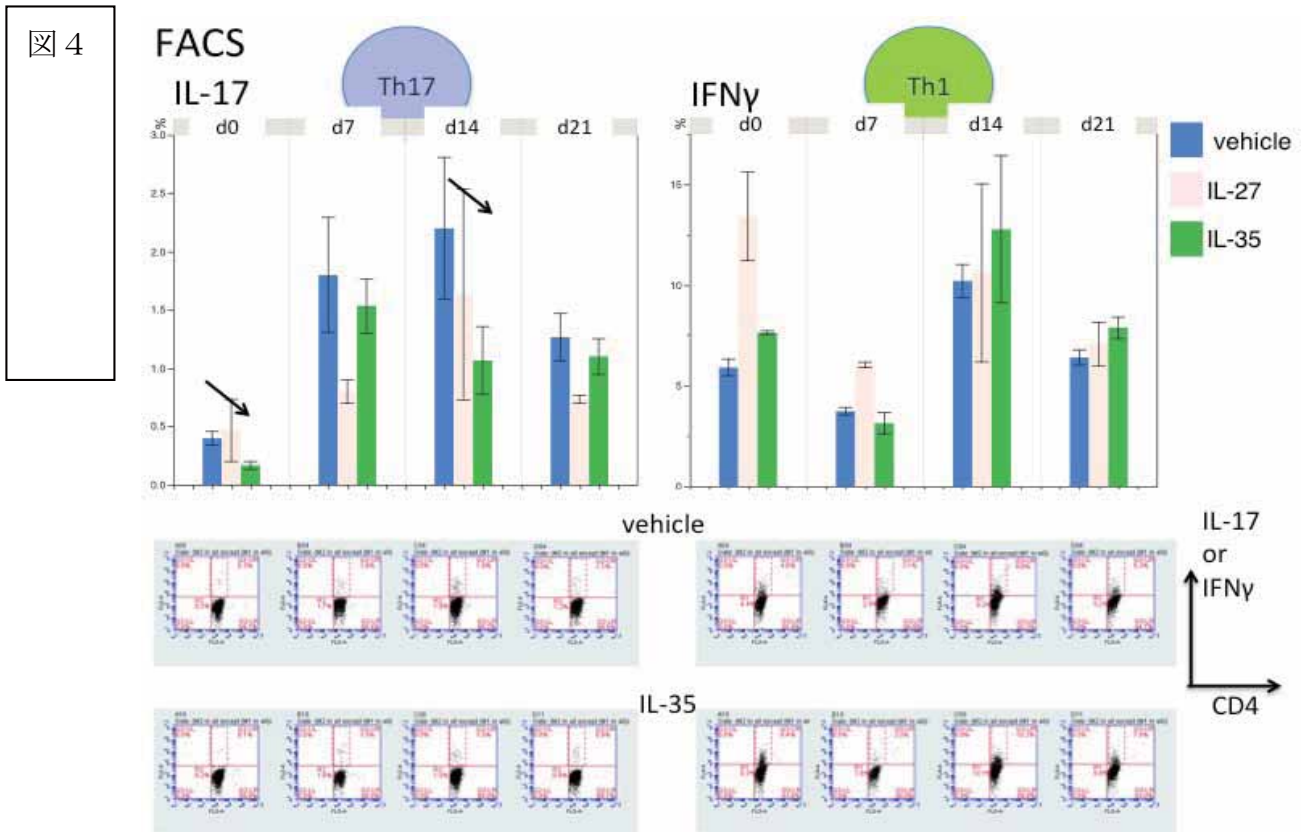


また EAU各期の所属リンパ 節・脾臓から精製したのCD4細胞をrIL-27、rIL-35で刺激しまたIFN- γ , IL-17、転写因子の発現をPCRにて検討した（図3）。またIFN- γ , IL-17産生を3日後にELISAで、FACS（図4）を用いて検討した。rIL-27刺激によってTh1特異的転写因子(T-bet)の発現上昇および Th17特異的転写因子(ROR γ t)の発現減弱がみられた。rIL-35ではEAU初期に於いてのIFN- γ 産生抑制およびEAU各期において有意にIL-17の発現を抑制がみられた。ELISAでも同様の効果が見られた。

☒
3

qPCR





以上より、IL-27は炎症初期のTh1誘導・炎症後期のTh17抑制、IL-35は炎症初期Th1抑制・炎症各期においてTh17の抑制作用があり、両サイトカインともに眼炎症を抑制する可能性が示唆された。現在in vivoにおけるサイトカインの効果に関する検討をすすめている。

発表論文

1. EBI3 is pivotal for the initiation of experimental autoimmune uveitis. Takeda A, Hasegawa E, Fukuhara T, Hirakawa S, Yamada H, Yang Y, Yoshimura T, Hisatomi T, Oshima Y, Yoshida H, Sonoda KH, Ishibashi T. *Exp Eye Res.* 2014 Jun 11;125C:107-113.
2. IL-10 is significantly involved in HSP70-regulation of experimental subretinal fibrosis. Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda KH, Ishibashi T. *PLoS One.* 2013 Dec 20;8(12):e80288
3. Melanocyte-secreted fibromodulin promotes an angiogenic microenvironment. Adini I, Ghosh K, Adini A, Chi ZL, Yoshimura T, Benny O, Connor KM, Rogers MS, Bazinet L, Birsner AE, Bielenberg DR, D'Amato RJ. *J Clin Invest.* 2014 Jan 2;124(1):425-36.

4. Suppression of autoimmune retinal inflammation by an antiangiogenic drug. Yoshimura T, Benny O, Bazinet L, D'Amato RJ. PLoS One. 2013 Jun 13;8(6):e66219.
5. Simultaneous analysis of multiple cytokines in the vitreous of patients with sarcoid uveitis. Nagata K, Maruyama K, Uno K, Shinomiya K, Yoneda K, Hamuro J, Sugita S, Yoshimura T, Sonoda KH, Mochizuki M, Kinoshita S. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Jun 20;53(7):3827-33.
6. Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide ameliorates experimental autoimmune uveitis. Suzuki J, Yoshimura T, Simeonova M, Takeuchi K, Murakami Y, Morizane Y, Miller JW, Sobrin L, Vavvas DG. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Jun 28;53(7):4158-69.
7. IL-23-independent induction of IL-17 from $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization. Hasegawa E, Sonoda KH, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Yoshida S, Ishibashi T, Yoshimura A. J Immunol. 2013 Feb 15;190(4):1778-87.
8. A Novel Platelet-Activating Factor Receptor Antagonist Inhibits Choroidal Neovascularization and Subretinal Fibrosis. Zhang H, Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda KH, Ishibashi T. PLoS One. 2013 Jun 27;8(6):e68173.

学会発表

1. 実験的自己免疫性ぶどう膜炎における IL-27 および IL-35 の役割. 平川沙弥香、吉村武、武田篤信、大島裕司、川野庸一、石橋達朗. 第 118 回日本眼科学会総会、東京、2014 年 4 月.

研究課題	口腔上皮細胞の分化にともなうゲノムのエピジェネティックな変化
研究代表者	坂上竜資（口腔治療学講座・歯周病学分野・教授）

要約

口腔内に特徴的な上皮の代表としては、①口腔粘膜上皮と②歯原性の上皮系組織とがある。われわれは、それぞれについてゲノムおよびエピジェネティックな変化について着目している。本報告書においては、この2つの系について大学院生の実験も交えて、恒常性維持のメカニズムと、老化と分化にいたるメカニズムについて、今後の展望を含めて記載する。口腔粘膜上皮については、4週齢と2年齢の同腹マウスの口蓋角化歯肉組織のトランスクリプトームを比較した。2年齢マウスでは、4週齢マウスに比較して1068の遺伝子の発現量が有意に増加し、1103の遺伝子の発現量が有意に減少していた。残りの43110（95.21%）の遺伝子に有意な発現量の変化は認めなかった。歯原性上皮系組織については、恒常性を保つ組織として歯の組織幹細胞について着目し、Sox2とOct4の発現が恒常的に維持されることを免疫組織学的に確認した。

①口腔粘膜上皮のエピジェネティックな変化について

口腔粘膜上皮は消化管の入り口で生体の最外層に位置しており、感染に対するバリアとして機能する。表皮には、角化上皮と粘膜上皮があり、口腔内では部位特異的に両者が分布している。口腔内の角化上皮の分布異常は歯周炎の進行に影響を与えるので、粘膜上皮で被覆された領域に角化上皮を移植する治療も行われている。これらのことから、口腔上皮細胞の発現遺伝子を網羅的に解析し、角化上皮細胞に特異的に発現する遺伝子を調べ、これらの遺伝子産物を口腔内感染症の疾患感受性あるいは老化のマーカー分子と関連づけて捉えることは意義があると考えられる。

本年大学院を卒業した村上は、薬理学の山崎教授の元で上皮と線維芽細胞からなる再構築モデルを作成し、上皮の角化を更新させる遺伝子発現機構についてカスパーゼ14に着目し、エピガロカテキン刺激により解明してきた。また大学院生D4の廣松が、同様に山崎教授の指導の元でマウス上皮細胞株におけるCLCA遺伝子の発現制御機構の解明に挑んでいる。

材料と方法

4週齢と2年齢の同腹マウスをサクリフェイスした後、直ちに口蓋角化歯肉組織を採取し、液体窒素にて急速冷凍、通法にしたがってmRNAを抽出後、cDNA合成を行なってDNAマイクロアレイ解析にてトランスクリプトームを比較した。

結果と考察

2 年齢マウスでは、4 週齢マウスに比較して 1068 の遺伝子の発現量が有意に増加し、1103 の遺伝子の発現量が有意に減少していた。残りの 43110 (95.21%) の遺伝子に有意な発現量の変化は認めなかった。また、周囲組織と比較した相対発現量が有意に高い遺伝子は、角化に関連するケラチンや関連タンパク質をコードするものが多かった。これらの遺伝子に限っては、4 週齢マウスに比較して 2 年齢マウスにおいて相対発現量が減少する遺伝子が多いことがうかがわれた。

今後の展望

角化口蓋歯肉上皮組織のトランスクリプトームに加えて、角化しない口腔粘膜上皮組織、ならびにその中間的な形質を有する接合上皮、ならびにこれらの形質の維持に関わると考えられている上皮結合組織のトランスクリプトームを調べ、相互に比較することで、口腔上皮のトランスクリプトームの特徴を網羅的に明らかにしたい。また、この解析からターゲット遺伝子を絞り込んで「加齢による発現変化とゲノムのエピジェネティックな変化との相関の探求、自然発症する歯周炎の組織学的、細菌学的な表現型の変化の探求」につなげたい。

②げっ歯類切歯における歯原性の上皮の動態について

口腔内に特徴的な歯原性の上皮としては、エナメル上皮、星状網、ヘルトビッチの上皮鞘、マラッセの上皮残遺、接合上皮などがあり、さらにエナメル上皮はエナメル質をつくるタンパクを分泌するという特徴がある。ヒトにおいては、歯の幹細胞ともいべき歯の形成を司る器官は、歯の形成時の最根尖の上皮組織に含まれていると考えられる。しかし、げっ歯類の切歯においては、組織幹細胞はほとんどその位置を変えず、上顎も下顎も伸び続けて細胞を提供し続ける。この意味において、このげっ歯類切歯に認められる歯髄幹細胞は老化に伴う影響を最も受けにくい組織の一つと考えることができる。この研究を極めることによって、分化や老化の影響を受けにくい、恒常性を誘導する遺伝的な背景が明らかにできる可能性がある。

この実験は大学院 D3 の丸尾と行っており、主に坂上が手術手技の開発と細胞培養、丸尾が病理組織作成と免疫染色、PCR 法などを行っている。本年から大学院卒後助教に採用された森は、東京女子医大にて 1 年間の研鑽を行なって、歯根膜細胞の分化誘導と歯根膜シートの作成に携わっている。

材料と方法

(1) サービカルループ細胞の分離培養の試み

生後 4-7 日齢のマウスから下顎切歯を含む組織を単離し、ディスパーゼ処理を行なって上皮と歯小

嚢を分離し、サービカルループの培養に最も適した条件を検索した。

(2) Sox2 と Oct4 の胎生期から幼若マウスに至る動態について

胎生 15, 17, 19 日齢, 生後 2, 4 日齢のマウスから下顎切歯を含むように組織を単離し、直ちに 10% ホルマリンに固定し、通法に従い切片の作製を行った。HE 染色にて組織部位を確認後、Sex-determining region Y-box 2 (Sox2) 陽性細胞の局在と密度を免疫組織化学的に調べた。

(3) マウス根尖部細胞塊の移植

また、生後 2 日齢マウスから摘出した cervical loop 部組織の異所性硬組織形成能は、摘出組織を 4 週齢マウスの腎臓皮膜下に移植して一定期間飼育後、マイクロ CT 装置を用いて移植部位に形成された石灰化物の量とサイズをもって評価した。

結果と考察

(1) サービカルループ細胞の分離培養について

サービカルループの培養については、以下の条件で成功している。

- ①サービカルループと周囲の線維芽細胞を含む根尖部の細胞を初期培養した場合、約 1 週間でアウトグロウスし、周囲に線維芽細胞を配した上皮細胞塊が形成される。
- ②サービカルループのみを取り出し、無コート、またはコラーゲンタイプ I のコートされたディッシュではアウトグロウスしない。
- ③サービカルループのみを取り出し、マトリゲルコートされたディッシュではアウトグロウスが可能。3 週間で 3-5 mm の大きさにまで広がる。
- ④サービカルループのみを取り出し、MEF (マウス胎仔線維芽細胞) 上に置くと、マトリゲルコートとほぼ同じペースでアウトグロウスする。
- ⑤①~④は全てサービカルループをほぼ一塊としてディッシュ上に置き、アウトグロウスさせた場合である。コラゲナーゼ処理を行なって細胞をバラバラにした場合には、どの条件であっても生長しなかった。また、継代操作に伴って細胞をバラバラにした場合も生長しなかった。カバーガラス上にマトリゲルを置いての初期培養は今のところ成功していない。

(2) Sox2 と Oct4 の胎生期から幼若マウスに至る動態について

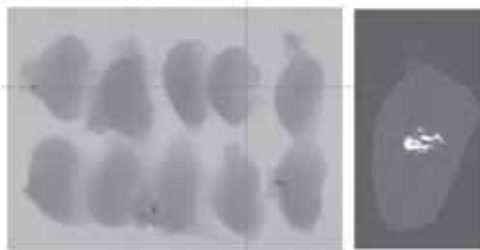
免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察

胎生ならびに幼若マウスの口腔組織において Sox2 の発現部位とその経時的変化を免疫組織化学的に検索したところ、胎生期および生後マウスにおいて Sox2 発現細胞は口腔粘膜上皮や歯胚に局在していた。さらに実験期間を通じて、Sox2 は Labial cervical loop 部に限局して発現することを見出した。さらに Oct4 については、Sox2 と同様に幹細胞と思われる位置において強発現していることを観察した。



(3) マウス根尖部細胞塊の移植

cervical loop 部組織を移植した腎臓に石灰化物が認められた。Labial cervical loop 部は、マウス切歯のエナメル質形成に関与する組織であることと合わせ、cervical loop 部組織には硬組織形成能を持つ細胞に分化しうる細胞が含まれ、Sox2 はそれらのエナメル形成に関わる幹細胞のマーカとなる可能性があると考えた。



マウス根尖部細胞塊の移植：生後 2 日齢マウスから摘出した cervical loop 部組織の異所性硬組織形成能は、摘出組織を 4 週齢マウスの腎臓皮膜下に移植して 4 週間飼育後、マイクロ CT 装置を用いて移植部位に形成された石灰化物の量とサイズをもって評価した。

今後の展望

マウスの下顎切歯のサービカルループを取り出し、これを in vivo にて下顎切歯の同じ部位に移植する方法を試行錯誤の末にほぼ完成した。これまでにこのような実験系の報告は無く、再植モデルとしてこれを発展し、研究の選択肢を拓けることを模索している。具体的には GFP マウスのサービカルループを取り出し、これをハイブリッドの歯胚として移植することでエナメル質を形成する細胞が生体内でどのように分化するかを追跡したい。近年、ヘルトビッチの上皮鞘が上皮間葉転換を起こしてセメント質に分化するとの報告も散見されており、われわれの実験系はこのメカニズムを証明することにも役立つと考えている。

発表論文

1. Morotomi T, Kitamura C, Okinaga T, Nishihara T, Sakagami R, Anan H (2014) Fever-Range Heat Stress Induces Thermotolerance in Odontoblast-lineage cells, Archives of oral biology, 査読有 59: 741-748, 2014.
2. Nishida E, Miyaji H, Takita H, Kanayama I, Tsuji M, Akasaka T, Sugaya T, Sakagami R, Kawanami M (2014) Graphene oxide coating facilitates the bioactivity of scaffold material for tissue engineering, Jpn. J. Appl. Phys, 査読有 53 06JD04 doi:10.7567/JJAP.53.06JD04, 2014.

3. Murakami H, Okamura K, Aoki S, Sakagami R, Yamazaki J. (2013) Association of caspase-14 and filaggrin expression with keratinization of the oral mucosa and reconstruction culture rat models.. Journal of Periodontal Research, 査読有 doi: 10.1111/jre.12152, 2013.
4. Mori, N., Ohno, J., Sakagami, R., Hayakawa, T., Fukushima, T. (2013) Cell viabilities and biodegradation rates of DNA/protamine complexes with two different molecular weights of DNA. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 査読有 101: 743-751, 2013.
5. Ohgi, K., Kajiya, H., Okamoto, F., Nagaoka, Y., Onitsuka, T., Nagai, A., Sakagami, R., Okabe, K. (2013) A novel inhibitory mechanism of nitrogen-containing bisphosphonate on the activity of Cl⁻ extrusion in osteoclasts. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, . 査読有 386: 589-598, 2013.
6. Sano, S., Sakagami, R., Sekiguchi, M., Hidaka, M. (2013) Stabilization of MAPO1 by specific binding with folliculin and AMP-activated protein kinase in O⁶-methylguanine-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 査読有 430:810-815, 2013.
7. Lim TH, Fujikane R, Sano S, Sakagami R, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M, Hidaka M. Activation of AMP-activated protein kinase by MAPO1 and FLCN induces apoptosis triggered by alkylated base mismatch in DNA.. DNA Repair (Amst). 査読有 211: 259-266, 2012

学会発表

1. Mori N, Washino K, Iwata T, Yoshida T, Fukushima T, Sakagami R, Yamato M, Okano T. (2013)Optimal conditions for creating rat periodontal ligament-derived multipotent mesenchymal stromal cell (RPDL-MSC) sheets . 12thCELL TRANSPLANT SOCIETY, Milan Italy
2. Ohgi K, Kajiya H, Okamoto F, Tsusumi T, Onitsuka T, Nagai A, Sakagami R, Okabe K (2012) Bisphosphonate as a novel target to the Clcn7 Cl⁻ transporter in osteoclasts. 第 89 回日本生理学会大会, 松本

3. 村上 弘, 岡村 和彦, 坂上 竜資, 山崎 純 (2012) ラット口腔粘膜再構築系における重層化・角化上皮でのカスパーゼ 14 の発現. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都
4. Murakami H, Okamura K, Sakagami R, Yamazaki J (2012) Expression of caspase-14 in stratified and cornified epithelium in a rat oral mucosal reconstruction model. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都
5. 丸尾直樹, 岡村和彦, 谷口邦久, 坂上竜資 (2012) マウス下顎切歯根尖部の多能性幹細胞における Sox2 の発現. 第 39 回福岡歯科大学学会, 福岡
6. 廣松 亮, 八田光世, 坂上竜資, 山崎 純 (2012) 培養上皮細胞における Cl-チャンネル調節因子の遺伝子発現解析. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 郡山
7. 大城希美子, 岡部幸司, 鬼塚得也, 永井 淳, 坂上竜資 (2012) 窒素含有ビスフォスフォネート (NBPs) は破骨細胞 CIC7 型 Cl-輸送体 (Clcn7) の機能を抑制する. 第 55 回日本歯周病学会春季学術大会, 札幌
8. 村上 弘, 岡村和彦, 山崎 純, 坂上竜資 (2012) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) による口腔粘膜の分化に対する影響. 第 55 回日本歯周病学会春季学術大会, 札幌
9. 佐野しおり, 坂上竜資, 関口睦夫, 日高真純 (2012) アポトーシス過程における MAPO1 の安定化. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡
10. Sakagami R, Nagai A, Kaneko N (2012) Surface roughness of curescopes sharpened by diamond dressers. American academy of periodontology 98th annual meeting, Los Angeles
11. Nagai A, Sakagami R (2012) Phylogenetic mapping of chronic periodontitis-associated microbiota to the human microbiome. American academy of periodontology 98th annual meeting, Los Angeles

研究課題	プロバイオティクスと口腔疾患
研究代表者	廣藤卓雄（総合歯科学講座・総合歯科学分野・教授）

要約

乳酸菌には、免疫賦活化作用、コレステロール低減作用、抗菌作用など、生体防御機能を発揮する菌株が多く、近年これらを腸内環境だけでなく口腔環境の健全化に利用しようという動きが出ている。われわれは健常人ボランティアを対象としたランダム化比較試験で、喫煙群においてプラーク付着と歯周ポケットの改善が報告された乳酸菌 *Lactobacillus salivarius* WB21 (Ls WB21) 株に着目し、本菌の口臭抑制効果を調べたところ、多くの口臭患者が2週間の継続摂取で口臭の改善を示した (Iwamoto T et al. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 110:201-208, 2010)。この研究は非盲検試験であったため、本研究では Ls WB21 配合タブレットの口臭抑制効果を明らかにするために、口臭患者を利用した二重盲検ランダム化クロスオーバー試験を実施した (文献 2)。その結果、Ls WB21 期ではプラセボ期に比較して揮発性硫黄化合物 (volatile sulfur compounds, VSCs) と歯周ポケットが有意に改善した。群内比較では Ls WB21 期にはプロービング時出血率 (bleeding on probing, BOP) が有意に減少したが、プラセボ期には変化がみられなかった。このように Ls WB21 タブレットには口臭と歯周組織の改善効果があることが明らかになった。

また、タブレットで誤嚥の危険性がある障害者や高齢者への応用を想定し、Ls WB21 配合オイルを開発し、その効果を臨床的に検討した (文献 12)。歯周病患者を対象としたプラセボ対照二重盲検比較試験を行ったところ、Ls WB21 配合オイル群ではプラセボオイル群に比較して、4週間の介入期間における BOP の改善率が有意に優れていた。

乳酸菌は酸を産生し、う蝕病巣より分離されることから、う蝕への関連性が示唆されている。そこで2種類の乳酸菌配合タブレット (Ls WB21 配合タブレットおよび Ls TI2711 配合タブレット) の摂取直後のう蝕リスク因子の変化を調べたところ、いずれもう蝕リスク因子を増加させることはなく、Ls WB21 タブレットではミュータンス菌数の減少が、Ls TI2711 タブレットでは刺激唾液量と唾液緩衝能の増加がみられ、う蝕リスク因子に対して抵抗性を示す傾向があった。

乳酸菌でない様々な口臭抑制剤についても、口臭や口腔内環境に与える影響を調べる必要がある。本研究では、ヒノキチオール配合口腔ケア用ジェル、塩化セチルピリジニウム (抗菌成分)・グリチルリチン酸二カリウム (組織修復成分)・キキョウエキス (唾液分泌促進成分) の3種の有効成分を配合したトローチ、亜鉛イオンについて、口臭や口腔内環境、口腔内細菌叢に与える影響を調べ、研究成果を報告した (文献 1, 5)。

研究目的

近年、数多くの介護老人保健施設や福祉施設が開設され多くの要介護高齢者・障害者が入所している。この領域において、口腔内の歯牙や歯周組織の病的悪化が、口臭、味覚障害、口腔機能や嚥下機能の低下を招き、誤嚥性肺炎や低栄養、認知症の進行につながるとされ、口腔ケアを含めた歯科治療の重要性が強く示唆されている。特に、口臭は要介護高齢者・障害者の口腔内環境の状態を示す指標として着目されている。本研究の目的は、口腔内にプロバイオティクスの概念を取り入れ、要介護高齢者・障害者に、口腔ケアと併用して安全性も確認されている有用性の高い乳酸菌の有効的な投与方法を確立し、乳酸菌を口腔内細菌叢と共存させることにより口腔内細菌叢を変化させ、歯周疾患などを含めた口腔内の健康状況を改善させるとともに、そのことによる全身的健康の改善を図るものである。

まず、すでに口臭患者を対象とした非盲検試験において口臭への有効性を報告した乳酸菌 *Lactobacillus salivarius* WB21 株を用いて、従来のタブレットタイプから舐めることが不可能な患者への利用を考慮したオイルタイプを開発し、歯周病患者に対し、プラセボを対照とした二重盲検ランダム化比較試験を実施した。タブレットについては前回の研究が非盲検試験であったため、口臭患者に対し、プラセボを対照とした二重盲検クロスオーバー比較試験を実施し、口臭への有効性を確認した。元来乳酸菌は進行したう蝕病巣より分離されることが知られており、酸を産生することから、利用する乳酸菌がう蝕に与える影響を確認しておく必要がある。そのため、乳酸菌配合タブレットの摂取前後におけるう蝕リスク因子の変化を調べた。また、乳酸菌以外の口臭抑制剤についても、効果の程度や口腔内環境に及ぼす影響について十分に検討されたものは少ない。本研究では、ヒノキチオール配合口腔ケア用ジェル、塩化セチルピリジニウム・グリチルリチン酸二カリウム・キキョウエキスの3種の有効成分を配合したトローチ、塩化亜鉛水溶液について、口臭や口腔内環境、口腔内細菌叢に与える影響を調べた。

方法

①Ls WB21 配合オイルの開発と口腔内環境に与える影響の検討

Ls WB21 配合オイルの作製は、わかもと製薬株式会社に依頼した。一般開業歯科医院の初診患者 42 名に対して、プラセボを対照とした二重盲検ランダム化比較試験を実施した。一日 3 回毎食後、舌背中央部にオイルを 5 滴滴下し、舌を使ってオイルを口腔内にまんべんなく行き渡るように指示した (4×10^8 CFU/day)。オイルの摂取は 2 週間継続し、実験開始前と開始 2 週間後に口腔内診査と唾液採取を行った。実験期間中には口腔清掃習慣を変えないように指示した。また実験期間中は抗菌薬服用と歯科治療を禁止した。歯式、歯周ポケット、BOP、刺激唾液量、pH、唾液中の細菌数を調べた。さらに唾液サンプルにつ

いて T-RFLP 法を用いて菌叢解析を行った。

②Ls WB21 配合タブレットの口臭抑制効果

口臭を主訴として福岡歯科大学医科歯科総合病院口臭クリニック科を受診した真性口臭症患者 26 名に対して、ランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験を行った。被験者を 2 群 (A 群および B 群) に無作為に割り付けし、第 1 期として A 群には Ls WB21 配合タブレット (2×10^9 CFU/day) を B 群にはプラセボを連続して 2 週間 1 日 3 粒摂取した。その後 2 週間の休薬期間を経て、第 2 期として、A 群にはプラセボを、B 群には Ls WB21 配合タブレットを 2 週間摂取した。両摂取期間の前後に、口臭検査と口腔内診査を実施した。検査当日は、起床時より飲食、歯面清掃、喫煙などの口腔活動を禁止した。

③Ls WB21 配合タブレットのう蝕リスクに対する影響

福岡歯科大学 6 年生 64 名を対象とした非盲検ランダム化比較試験を実施した。被験者をくじ引きにより無作為に 4 群にわけ、Ls WB21 配合タブレット、Ls TI2711 配合タブレット、比較対象品として *Streptococcus mutans* に対する抗体を配合したオーバルゲン DC 配合タブレット、キシリトール配合タブレットのいずれかを割り当てた (表 1)。タブレットは噛まずに舐めるよう指示し、摂取前と摂取 10 分後のミュータンス菌数、乳酸菌数、刺激唾液量、唾液 pH、唾液緩衝能の変化を評価した。

表 1. 試験群と割付の内訳

群 (n)	WB21 (n=17)	LS1 (n=16)	オーバルゲン DC (n=13)	キシリトール (n=18)
商品と成分				
商品名	みんなの善玉菌 WB21 タブレット (わかもと製薬)	スーパークリッシュ (フレンテ・インターナショナル)	ハキラ (ビーンスターク)	WB21 タブレットから乳酸菌を取り除いたもの (わかもと製薬)
有効成分 (1 錠あたり)	<i>L. salivarius</i> WB21: 6.7×10^8 CFU Xylitol: 280 mg	<i>L. salivarius</i> LS1: 2.8×10^8 CFU Xylitol: 450 mg	<i>S. mutans</i> GTF の抗体 Xylitol: 100 mg	Xylitol: 280 mg
味	ミント	クリーンミント	オレンジ	ミント

③ ヒノキチオール配合ジェルによる口腔清掃が口臭に与える影響

福岡歯科大学医科歯科総合病院口臭クリニック科を受診した真性口臭症患者 18 名に対して、ランダム化比較試験を行った。被験者は無作為にヒノキチオール配合ジェル群 (実験群、9 名) とヒノキチオール無配合ジェル群 (対照群、9 名) に割り当てられた。口腔清掃は 1 日 3 回 (毎食後)、以下の通りに行うよう指示した。1) 歯ブラシにジェルを 1 cm 取る、2) 歯と歯肉の清掃を 3 分間行う、3) 舌ブラシで 5 回舌清掃を行う、4) 歯磨き終了後ゆすいだ後に、再度ジェルを 2cm 指に取り、口腔内全体にマッサージしながら広げ、清掃後 30 分は飲食をしない。使用開始前 (ベースライン) と 4 週後に、口臭検査と口腔内診査を実施した。

⑤3種の有効成分を配合した口腔咽喉薬の口臭抑制効果

福岡歯科大学 6 年生 82 名を対象とした非盲検ランダム化比較試験を実施した。被験者はくじ引きでランダムに 4 群にわけられ、1錠あたり塩化セチルピリジニウム (CPC) 1 mg、グリチルリチン酸二カリウム 2.5 mg、キキョウエキス 20 mg (原生薬換算量: 80 mg) の 3 種の有効成分を配合した口腔咽喉薬 (ローズウインド)、CPC 1 mg のみを配合した口腔咽喉薬 (プロテクトドロップ)、有効成分を配合しない清涼菓子 (フリスク)、水による洗口のいずれかが割り当てられた。摂取あるいは洗口前後に、口臭、舌保湿度、刺激唾液量、唾液 pH、唾液緩衝能の変化を調べた。口臭の少ない被験者が多いため、口臭測定前に 1 mM メチオニン水溶液で洗口し、誘発した VSCs 濃度が 80 ppb 以上の場合を解析対象とした。

表 2. 成分表と割付 (n は解析対象者数)

試験群 有効成分 (1錠あたり)	ローズ ウインド (n=15)	プロテクト ドロップ (n=14)	フリスク (n=14)	水洗口 (n=14)
塩化セチルピリジニウム	1 mg	1 mg	-	
グリチルリチン酸二カリウム	2.5 mg	-	-	
キキョウエキス (原生薬換算量)	20 mg (80 mg)	-	-	

⑥ヒト口腔内細菌叢に対する亜鉛イオンの影響

まず福岡歯科大学歯学部学生 21 名を対象に、短期介入実験を行った。市販水で 3 日間洗口、続いて 3 日間のウォッシュアウト期間を挟んで、0.1%塩化亜鉛溶液で 3 日間洗口を行った。洗口は一日 3 回、5 mL 液で 1 分間実施した。洗口開始前日と 3 日目の終業後、3 日目は昼食後の洗口から 5 時間後に、刺激唾液を採取した。唾液サンプルから抽出した細菌 DNA を抽出し 16S rRNA 遺伝子を利用した高速シーケンス解析法によって細菌構成の決定を行った。分析では検出率 0.3%未満の菌種を解析対象外とした。

次に、福岡医療短期大学学生 20 名を対象として、長期介入実験を実施した。被験者は、0.3%塩化亜鉛溶液 5 mL で一日 3 回、4 週間洗口を行った。洗口開始前と 4 週間後の終業後に、飲食および洗口から 4 時間以上経過した条件で刺激唾液を採取した。唾液より抽出した細菌 DNA から、16S rRNA 遺伝子を PCR によって増幅し、高速シーケンス解析法によって 1150 万リード数 (約 2.8 億塩基) の配列が得られた。OTU 解析後、口腔内細菌 16S rRNA 塩基配列データベースを用いて相同性検索を行い、菌叢解析を行った。

結果と考察

①Ls WB21 配合オイルの開発と口腔内環境に与える影響の検討

Ls WB21 群は 20 名、プラセボ群は 22 名であった。年齢、性別、実験開始前の臨床および細菌パラメータの群間比較において、統計学的有意な差はみられなかった。実験開始前

と 2 週間後の臨床パラメータの変化について解析したところ、両群とも BOP の減少と刺激唾液量の増加が有意に認められた。続いて BOP の変化について群間比較を行ったところ、Ls WB21 群はプラセボ群に比較して BOP が有意に減少しており、本菌の炎症改善能力を確認することができた (図 1)。唾液中の菌数解析では、全菌数が WB21 群で有意に減少した。また有意差はないが、Ls WB21 群では歯周病細菌 *Prevotella intermedia*, *T. forsythensis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* の菌数が減少した。これに対してプラセボ群では歯周病細菌の減少はみられず、*P. intermedia* においては有意に増加した。*L. salivarius* 菌数は Ls WB21 群で有意に増加したが他の口腔内細菌に対して菌数は少なく、過剰増殖は認められなかった。T-RFLP 解析による菌叢解析では、Ls WB21 投与によって特徴的に増減する菌種は認められなかった。

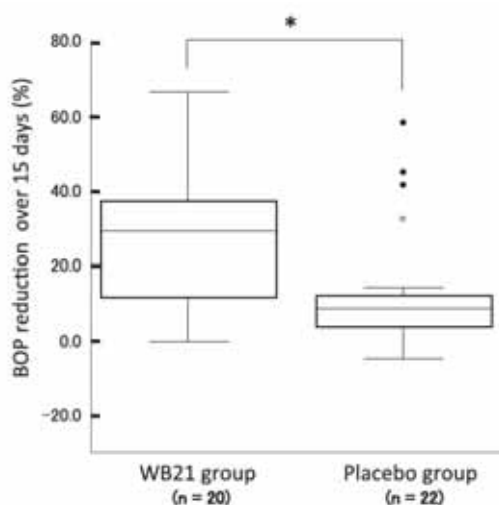


図 1. BOP の減少率. * $P < 0.05$.

②Ls WB21 配合タブレットの口臭抑制効果

実験期間中に脱落した者 1 名と抗菌薬を服用した者 2 名を分析対象外とし、23 名 (男性 4 名、女性 19 名、平均年齢 44.3 ± 11.6 歳) について比較分析を行った。両群ともに Ls WB21 配合タブレット摂取期間はプラセボ摂取期間と比較して、VSCs と歯周ポケット平均値に有意な減少を認めた (図 2, 表 3)。

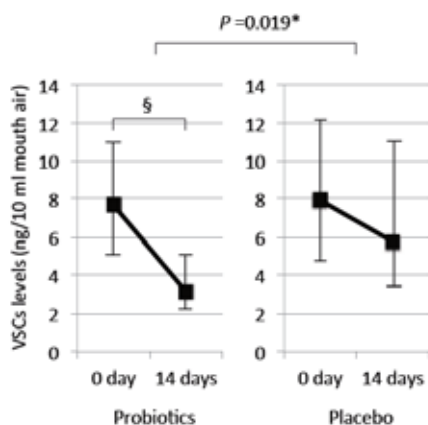


図 2. VSCs の変化

Table 3. Changes in clinical parameters including average of PPD, BOP sites, PII, and salivary flow rate [median ± (IQR)].

Clinical parameter	Probiotics (n = 23)		Placebo (n = 23)		Comparison between the periods*
	0 day	14 days	0 day	14 days	
Average PPD (mm)	2.5 [2.3-2.8]	2.4 [2.2-2.6]	2.5 [2.3-2.7]	2.4 [2.2-2.7]	0.001
BOP sites	13.0 [4.0-27.5]	11.0 [5.0-17.5]	13.0 [7.5-21.5]	10.0 [5.0-23.0]	0.204
PII	0.3 [0.3-0.6]	0.3 [0.3-0.4]	0.4 [0.3-0.5]	0.3 [0.2-0.5]	0.737
Salivary flow rate (mL/ 5 min)	7.5 [5.3-8.8]	8.0 [5.0-9.5]	7.5 [4.8-9.8]	8.0 [5.3-10.5]	0.306

*Comparisons between the probiotics and placebo periods were conducted by generalized estimating equation analysis.

VSCs を 3 成分に分類し Ls WB21 摂取期間とプラセボ摂取期間を比較した結果、Ls WB21 摂取期間のほうが硫化水素濃度とメチルメルカプタン濃度において有意な減少が観察された。硫化水素とメチルメルカプタンは口腔由来の主要な口臭成分であり Ls WB21 が口腔由来の口臭に対して抑制作用を示すことが示唆された。歯周ポケットを 4 ミリ以上、5 ミリ以上、6 ミリ以上の部位数において Ls WB21 摂取期間とプラセボ摂取期間を比較した結果、Ls WB21 摂取期間では 6 ミリ以上のポケット数において有意な減少、5 ミリ以上のポケット数においても減少傾向を示した。官能検査、BOP、舌苔付着量、唾液流出量においては両期間ともに改善し、両者間に統計学的な違いがみられなかった。乳酸菌 Ls WB21 配合タブレットの摂取は、VSC レベルの減少、特に口腔由来の口臭として重要な硫化水素とメチルメルカプタンの減少、5 ミリ以上の歯周ポケットの減少をもたらし、口臭予防や口臭治療の一助となる可能性が示唆された。

③Ls WB21 配合タブレットのう蝕リスクに対する影響

Ls WB21 配合タブレット群、Ls TI2711 配合タブレット群、オーバルゲン DC タブレット群では、いずれもキシリトールタブレット群に比較してミュータンスレベルを抑える傾向がみられた (図 3)。Ls WB21 配合タブレット群とキシリトールタブレット群の間に統計学的有意差が認められた。乳酸菌レベルについては、Ls WB21 配合タブレット群および Ls TI2711 配合タブレット群では、顕著に唾液中の乳酸菌数が増加し、オーバルゲン DC タブレット群、キシリトールタブレット群との間に統計学的有意差がみられた。これらのタブレット摂取では生きた乳酸菌が作用していることが確認された。刺激唾液量については、Ls TI2711 配合タブレットで増加し、キシリトールタブレットとの間に統計学的有意差がみられた。タブレットを舐めることにより唾液量が増加すると予想していたが、Ls WB21 配合タブレットとオーバルゲン DC タブレットでは唾液増加はみられなかった。唾

液 pH については、いずれの群もタブレット摂取後に唾液 pH の増加がみられ、群間で統計学的有意差はみられなかった。唾液緩衝能については、キシリトールタブレット群で唾液緩衝能の減少がみられた。これに対し Ls TI2711 タブレット群とオーバルゲン DC タブレット群では増加傾向がみられ、キシリトールタブレット群との間に統計学的有意差を認めた。

Ls WB21 配合タブレットでは摂取後にミュータンスレベルの減少が、Ls TI2711 配合タブレットでは刺激唾液量と唾液緩衝能の増加がみられ、これらのタブレット摂取はう蝕リスクに対して抵抗性を示すことがわかった。

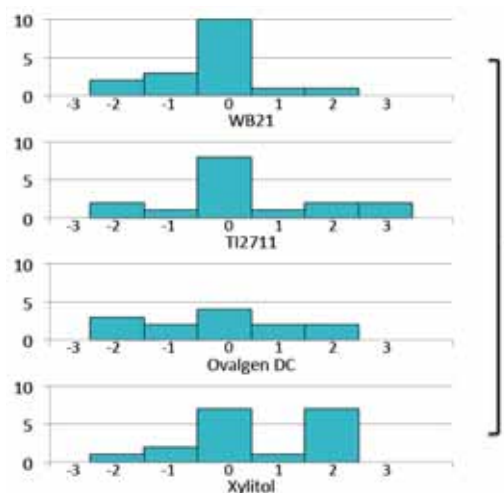


図 3. ミュータンスレベルの変化. $P < 0.05$.

④ヒノキチオール配合ジェルによる口腔清掃が口臭に与える影響

ベースライン解析において、実験群と対照群の間に口臭レベルと口腔内状態の統計学的違いはみられなかった。ベースラインと 4 週後の結果を比較したところ、口臭検査においては、実験群で官能検査スコア、硫化水素濃度、メチルメルカプタン濃度に有意な改善が、対照群で官能検査スコアに有意な改善が認められた (図 4)。特に実験群では 2 名が、官能検査スコアで「口臭なし」と判定するスコア 1 以下に改善した。口腔内診査においては、実験群で平均歯周ポケット、BOP の割合、プラーク付着指数の有意な減少がみられた。一方、対照群では BOP の割合に若干の改善があったものの、統計学的有意差はみられなかった。舌苔スコアと舌表面の保湿度については、両群ともに変化しなかった。ヒノキチオール配合口腔ケア用ジェルによる口腔清掃は、歯周組織の状態を改善することによって口臭の改善に寄与すると考えられる。

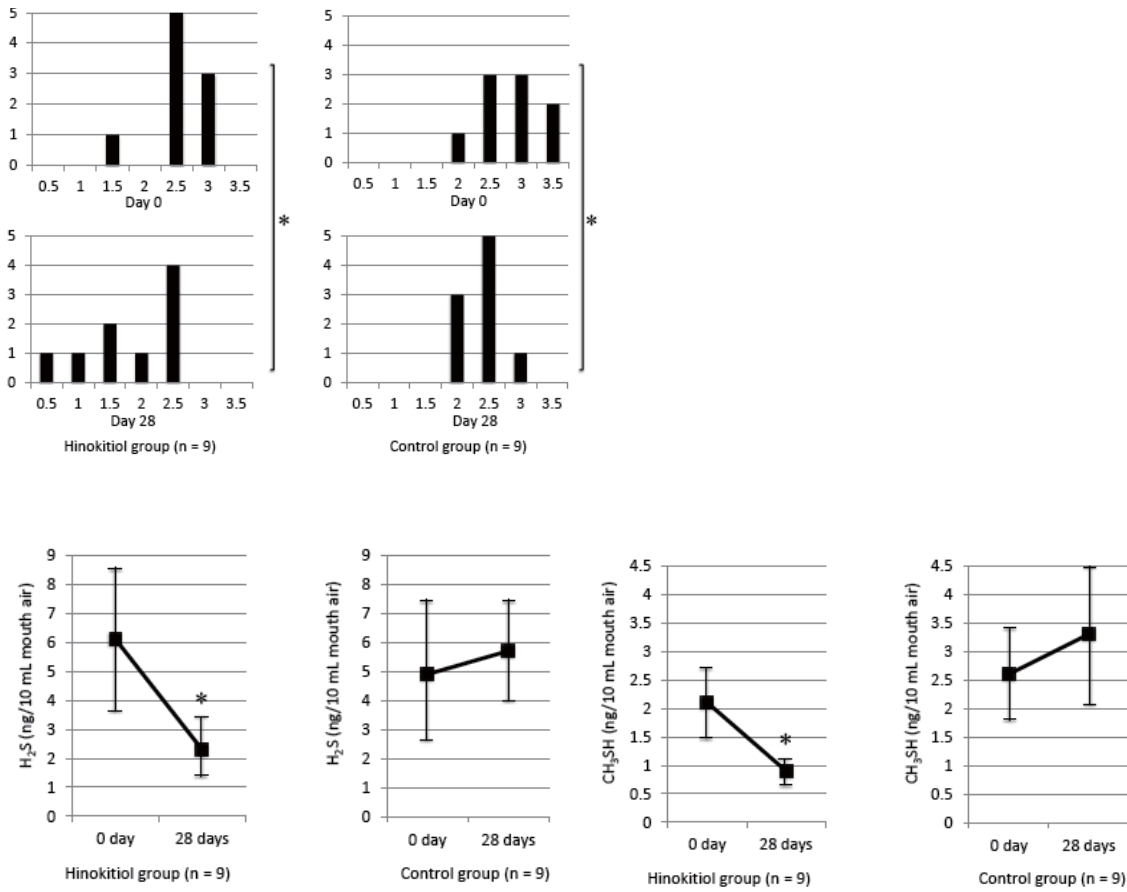


図 4. 官能検査スコア (上) と硫化水素 (左) とメチルメルカプタン (右) の変化

⑤3種の有効成分を配合した口腔咽喉薬の口臭抑制効果

口臭測定値はすべての群で減少した。ローズウインド群、プロテクトドロップ群、フリスク群では摂取前後に統計学的有意差がみられ、いずれも水よりも優れた口臭抑制効果があることがわかった (図 5)。ローズウインド群とプロテクトドロップ群においては、通常口臭がないとみなす 100 ppb 以下に改善し、CPC による抗菌作用が考えられる。

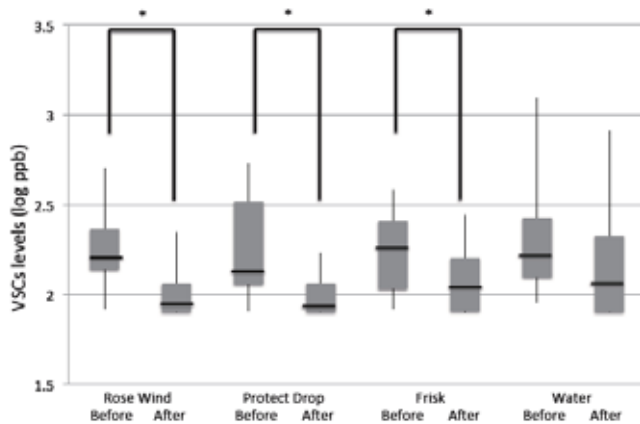


図 5. VSCs レベルの変化. $P < 0.05$.

舌保湿度はローズウインド群で増加傾向を示した。キキョウエキスには止渴作用がある

と言われる。口腔乾燥は口臭の一因であると考えられており、ローズウインドでは保湿向上による口臭抑制効果の持続性が期待される。またローズウインドでは唾液 pH に、プロテクトドロップでは唾液緩衝能に、それぞれ摂取後に有意な増加がみられ、これらは唾液機能を正常化し、口腔内環境の健全化に働くことが示唆された。

⑥ヒト口腔内細菌叢に対する亜鉛イオンの影響

短期介入実験において、3日間の塩化亜鉛溶液による洗口前後の菌の変動を調べたところ、18菌種が増加、18菌種が減少した。顕著に増加した菌種は *Actinomyces* 属や *Streptococcus* 属などの口腔常在菌であった。*Porphyromonas* 属や *Fusobacterium* 属などの VSC 産生菌は統計学的に有意に減少し、塩化亜鉛洗口が口臭のコントロールに有用であることが示された。また *P. gingivalis* との凝集関係が知られる *S. gordonii* も有意に減少した。亜鉛イオンは *P. gingivalis* のタンパクと結合することによって *P. gingivalis* と *S. gordonii* の共凝集を阻害するという研究報告があり、亜鉛イオンが菌叢変動に間接的にも作用している可能性が示唆された。

2ヶ月の長期介入では、*Terrahaemophilus aromaticivorans*、*Porphyromonas* 属細菌、*Fusobacterium nucleatum*、*Corynebacterium durum* などが減少し、口臭の原因菌として報告されている菌種が複数含まれていた。一方、*Rothia* 属、*Actinomyces* 属などに増加する菌種が見られた。しかし、全体として細菌叢構成種における大きな変動は見られず、亜鉛イオンの影響を受ける種は一部に限られることが判った。口臭の原因菌として知られているものが複数減少することが明らかになり、亜鉛イオンは揮発性硫化物と結合するだけでなく、口臭原因菌の生育を抑えることでも口臭を抑制する効果をもたらさすことが示唆された。

発表論文

1. 仲西宏介、鈴木奈央、米田雅裕、山田潤一、廣藤卓雄、口臭除去を効能とする口腔咽喉薬（トローチ剤）の臨床的評価、日歯保存誌、2014 印刷中（査読あり）。
2. Suzuki N, Yoneda M, Tanabe K, Fujimoto A, Iha K, Seno K, Yamada K, Iwamoto T, Masuo Y, Hirofuji T. *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets for the treatment of oral malodor: a double blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, 2014, 117(4):462-470 (査読あり)。
3. Suzuki N, Yoneda M, Haruna K, Masuo Y, Nishihara T, Nakanishi K, Yamada K, Fujimoto A, Hirofuji T. Effects of S-PRG eluate on oral biofilm and oral malodor. Archives of Oral Biology, 2014, 59(4):407-413 (査読あり)。
4. Nakano Y, Takeshita T, Kamio N, Shiota S, Shibata Y, Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji

- T, Yamashita Y. Supervised machine learning-based prediction of oral malodor based on the microbiota in saliva samples. *Artificial Intelligence in Medicine*, 2014, 60(2014):97-101 (査読あり).
5. Iha K, Suzuki N, Yoneda M, Takeshita T, Hirofuji T. Effect of mouth cleaning with hinokitiol-containing gel on oral malodor: a randomized, open-label pilot study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. 2013, 116(4):433-439., doi:pii:S2212-4403(13)00276-9.10.1016/j.oooo.2013.05.021 (査読あり).
 6. Seno K, Ohno J, Ota N, Hirofuji T, Taniguch. Lupus-like oral mucosal lesions in mercury-induced autoimmune response in brown norway rats. *BMC Immunology*. 2013; 14: 47 doi: 10.1186/1471-2172-14-47.(査読あり).
 7. 米田雅裕、古賀千尋、鈴木奈央、高向和宣、内藤 徹、豊村研吾、金光芳郎、廣藤卓雄、口臭恐怖のため精神科病院での入院加療を要した症例、*日本歯科心身医学会雑誌*、27(1, 2) 31-36, 2012 (査読あり).
 8. Yoneda M, Kashio N, Uchida H, Suzuki N, Matsuura H, Naito T, Koga C, Yasukochi H, Matsuura M, Hirofuji T. Awareness among dental hygienists with regard to treatment options for halitosis. *International Journal of Clinical Preventive Dentistry* 2012, 8(3):173-179 (査読あり).
 9. 畑野優子、鈴木奈央、米田雅裕、廣藤卓雄 乳酸菌配合歯磨剤 (アバンビーズ) の口腔衛生改善効果についての臨床研究、*日歯保存誌* 55(3):219-226, 2012 (査読あり).
 10. Yoneda M, Suzuki N, Masuo Y, Fujimoto A, Iha K, Yamada K, Iwamoto T, Hirofuji T. Effect of S-PRG eluate on biofilm formation and enzyme activity of oral bacteria. *Int J Dent*, 2012, ID814913, 6 pages, doi:10.1155/2012/814913 (査読あり).
 11. Suzuki N, Tanabe K, Takeshita T, Yoneda M, Iwamoto T, Oshiro S, Yamashita Y, Hirofuji T. Effects of oil drops containing *Lactobacillus salivarius* WB21 on periodontal health and oral microbiota producing volatile sulfur compounds. *J Breath Res*, Mar;6(1):017106, 2012. Doi:10.1088/1752-7155/6/1/017106 (査読あり).
 12. Takeshita T, Suzuki N, Nakano Y, Yasui M, Yoneda M, Shimazaki Y, Hirofuji T, Yamashita Y. Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl mercaptan production. *Scientific Reports* 2:215, 2012. DOI: 10.1038/srep00215, 2012 (査読あり).
 13. Masuo Y, Suzuki N, Yoneda M, Naito T, Hirofuji T. Salivary β -galactosidase activity affects physiological oral malodor. *Archives of Oral Biology*, Jan 57(1):87-93, 2012 (査読あり).
 14. Yoneda M, Suzuki N, Mocado SM, Fujimoto A, Iha K, Koga C, Matsuura M, Hirofuji T. The variable etiology of oral pathologic halitosis: a case series. *Smile Dental*

総説

15. Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. Int J Dent. Volume 2013, Article ID 587279, 6 pages, 2013 (査読あり).

著書

16. Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Relationship between oral malodor and oral microbiota. Oral Health Care-Prosthodontics, Periodontology, Biology, Research and Systemic Conditions (ISBN 978-953-51-0040-9), In Tech, Feb, 2012.

学会発表

1. 藤本暁江、谷口奈央、伊波幸作、米田雅裕、山田和彦、瀬野恵衣、廣藤卓雄、ヒノキチ オールの *Porphyromonas gingivalis* に対する抗菌作用と口臭改善効果について、第 55 回日本歯科医療管理学会総会・学術大会、札幌市、2014.7.18-20.
2. 仲西宏介、鈴木奈央、藤本暁江、伊波幸作、瀧井 慶、福地浩文、米田雅裕、廣藤卓雄、口臭の除去を効能とする口腔咽喉薬の臨床的評価、第 5 回日本口臭学会、
3. 山田潤一、鈴木奈央、仲西宏介、伊波幸作、藤本暁江、瀧井 慶、米田雅裕、山田和彦、梶尾陽介、萩尾佳那子、廣藤卓雄、3 種の有効成分を配合した口腔咽喉薬の口臭抑制効果、第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会、大津市、2014.6.19-2014.6.20.
4. 西原哲世、鈴木奈央、藤本暁江、米田雅裕、田邊一成、山田和彦、岩元知之、安 忠大、伊波幸作、瀬野恵衣、廣藤卓雄、乳酸菌配合タブレットがう蝕リスク因子に与える影響の臨床的評価、第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会、大津市、2014.6.19-2014.6.20.
5. 瀬野恵衣、大野 純、山田和彦、谷口奈央、廣藤卓雄、ラット歯肉炎モデルでの免疫応答-なぜ臨床的態度に違いが出るのか？ 第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会、大津市、2014.6.19-2014.6.20.
6. 鈴木奈央、米田雅裕、田邊一成、廣藤卓雄、乳酸桿菌 *Lactobacillus salivarius* 配合タブレットがう蝕リスク因子に与える影響、第 63 回日本口腔衛生学会総会、熊本市、2014.5.29~5.31.
7. 上村吏絵、米田雅裕、草場裕美、岩村裕美、杉本由紀子、大家知子、鈴木奈央、廣藤卓雄、福岡歯科大学口腔医療センター口臭クリニックの患者分析、第 57 回日本歯周病学会春季学術大会、平成 26 年 5 月 22-24 日、岐阜市
8. 瀬野恵衣、大野純、山田和彦、谷口奈央、廣藤卓雄、ラット全身性免疫応答モデルにおける歯肉炎の病態、第 139 回日本歯科保存学会秋期学術大会、福岡市、2013.10.17-18, 2013.

9. 瀬野恵衣、大野純、山田和彦、谷口奈央、谷口邦久、廣藤卓雄、オートファジーと cancer sphere 形成能の関連、第 40 回福岡歯科大学学会、福岡市、2013.12.15, 2013.
10. 岩元知之、鈴木奈央、米田雅裕、山田和彦、榊尾陽介、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、廣藤卓雄、プロバイオティクスを用いた口腔疾患の予防管理への取り組み、歯科人間工学会、名古屋市、2013.11.22-23, 2013.
11. 瀬野恵衣、大野 純、山田和彦、谷口奈央、廣藤卓雄、総合歯科診療科における細胞診の実践、総合歯科協議会、東京、2013.11.16-17, 2013.
12. 伊波幸作、鈴木奈央、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、藤本暁江、瀬野恵衣、春名一人、安 忠大、入江丹佳子、西原哲世、仲西宏介、廣藤卓雄、ヒノキチオール配合ジェルを用いた口腔ケアの口臭改善効果、総合歯科協議会、東京、2013.11.16-17, 2013.
13. 藤本暁江、米田雅裕、鈴木奈央、内藤 徹、山田潤一、廣藤卓雄、口臭恐怖のため精神科病院での入院加療を要した症例（仮）、日本歯科保存学会、秋田市、2013.
14. 春名一人、鈴木奈央、米田雅裕、山田潤一、榊尾陽介、西原哲世、仲西宏介、山田和彦、岩元知之、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、安 忠大、入江丹佳子、廣藤卓雄、S-PRG 溶出液が口腔バイオフィルムと口臭に及ぼす阻害作用、日本歯科保存学会、秋田市、10.17-10.18, 2013
15. Suzuki N, Yoneda M, Tanabe K, Fujimoto A, Iha K, Seno K, Iwamoto T, Yamada K, Masuo Y, Haruna K, and Hirofujii T, Improvement of oral malodor using *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets, WCPD, Budapest, 10.9-12, 2013.
16. 藤本暁江、鈴木奈央、米田雅裕、伊波幸作、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、瀬野恵衣、廣藤卓雄、口臭関連細菌に対するヒノキチオールの抗菌作用とヒノキチオール配合ジェルによる口腔ケアの口臭改善効果、第 4 回日本口臭学会（横浜市）、7.13, 14, 2013.
17. 伊波幸作、鈴木奈央、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、藤本暁江、瀬野恵衣、春名一人、安 忠大、入江丹佳子、西原哲世、仲西宏介、廣藤卓雄、ヒノキチオール配合ジェルを用いた口腔ケアが口臭及び口腔内環境に与える影響、第 138 回日本歯科保存学会春季学術大会（福岡市）、6.27, 28, 2013.
18. 松浦洋志、米田雅裕、鈴木奈央、岡田英美子、藤本暁江、廣藤卓雄、長期間悩まされていた口腔異常感が口腔乾燥に対する処置で消失した症例、第 138 回日本歯科保存学会春季学術大会（福岡市）、6.27, 28, 2013.
19. 中野善夫、鈴木奈央、米田雅裕、廣藤卓雄、横瀬勝美、桑田文幸、ヒト口腔内細菌叢の構成に対する亜鉛イオンの影響、第 85 回日本生化学会大会（福岡市）12.14-16, 2012.
20. 杉本由紀子、米田雅裕、鈴木奈央、廣藤卓雄、不適合修復物の除去および歯周外科により口臭が完全に消失した症例、第 55 回日本歯周病学会学術大会（つくば市）9.23, 2012.
21. 松浦洋志、米田雅裕、鈴木奈央、内藤 徹、廣藤卓雄、口臭治療についての意識-歯科

衛生士を対象とした調査結果-、第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (広島市)
11.22-23, 2012.

22. 榊尾陽介、鈴木奈央、米田雅裕、安 忠大、仲西宏介、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、山田和彦、岩元知之、廣藤卓雄、S-PRG 溶出液と S-PRG 配合歯面研磨剤の口腔バイオフィルムへの影響、第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (広島市) 11.22-23, 2012.
23. 伊波幸作、鈴木奈央、藤本暁江、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、西原哲世、金子元気、春名一人、廣藤卓雄、ヒノキチオール配合口腔ケア用ジェルによる口腔清掃の口臭改善効果、第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (広島市) 11.22-23, 2012.
24. 榊尾陽介、鈴木奈央、米田雅裕、安 忠大、仲西宏介、藤本暁江、伊波幸作、瀬野恵衣、山田和彦、岩元知之、廣藤卓雄、S-PRG イオン溶出液と S-PRG 配合歯面研磨剤の口腔バイオフィルムへの影響、第 39 回福岡歯科大学学会総会 (福岡市) 11.18, 2012.
25. 伊波幸作、鈴木奈央、藤本暁江、米田雅裕、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、西原哲世、金子元気、春名一人、廣藤卓雄、ヒノキチオール配合口腔ケア用ジェルによる口臭改善効果の臨床研究、第 39 回福岡歯科大学学会総会 (福岡市) 11.18, 2012.
26. 加塩奈津希、米田雅裕、内田初美、鈴木奈央、内藤 徹、縄田和歌子、黒田美和子、力武紗由美、廣藤卓雄、口臭治療に関する歯科衛生士の意識調査、第 39 回福岡歯科大学学会総会 (福岡市) 11.18, 2012.
27. 米田雅裕、古賀千尋、鈴木奈央、内藤 徹、廣藤卓雄、福岡歯科大学口腔医療センター口臭科の患者解析および口臭恐怖症の 1 症例、第 27 回日本歯科心身医学会総会・学術大会、平成 24 年 9 月 1 日、2 日、川越市
28. 藤本暁江、鈴木奈央、米田雅裕、伊波幸作、田邊一成、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、廣藤卓雄、真性口臭症における *Lactobacillus salivarius* WB21 株配合錠菓の有用性の検討、第 3 回日本口臭学会、平成 24 年 7 月 7, 8 日、東京
29. 鈴木奈央、中野善夫、米田雅裕、横瀬勝美、桑田文幸、廣藤卓雄、塩化亜鉛溶液の洗口による口腔内細菌叢の変動、第 3 回日本口臭学会、平成 24 年 7 月 7, 8 日、東京都
30. 鈴木奈央、中野善夫、畑野優子、米田雅裕、横瀬勝美、桑田文幸、廣藤卓雄、塩化亜鉛曝露による口腔細菌構成の変化、第 136 回日本歯科保存学会春季大会、平成 24 年 6 月 28, 29 日、宜野湾市
31. 藤本暁江、鈴木奈央、米田雅裕、田邊一成、山田和彦、岩元知之、榊尾陽介、伊波幸作、廣藤卓雄、*Lactobacillus salivarius* WB21 株配合錠菓の口臭抑制効果についての臨床研究～ランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験～、第 136 回日本歯科保存学会春季大会、平成 24 年 6 月 28, 29 日、宜野湾市
32. 加塩奈津希、米田雅裕、内田初美、鈴木奈央、内藤 徹、村上早苗、安河内ひとみ、廣藤卓雄、口臭治療に関する歯科衛生士の意識調査、第 55 回日本歯周病学会春季大会、平成 24 年 5 月 17-19 日、札幌市

研究課題	加齢に伴う口腔環境の変化および口腔環境の改善
研究代表者	米田 雅裕（総合歯科学講座・総合歯科学分野・教授）

要約

界面機能性ガラス surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) は各種イオンを徐放することが知られており様々な生物活性が認められている。われわれは口腔細菌に対する影響を調べ下記の結果を得た。S-PRG 溶出液は *Porphyromonas gingivalis* のプロテアーゼ活性、ゼラチン分解活性を抑制し、*Fusobacterium nucleatum* との共凝集を阻害した。グラム陽性菌によるバイオフィーム形成を抑制したが、 β -ガラクトシダーゼに対する作用は認められなかった。唾液中の細菌によるバイオフィーム形成を阻害し、さらに形成された唾液バイオフィームを破壊する能力も認められた。以上の結果から S-PRG はう蝕や歯周炎の予防に効果があると考えられる。そして加齢に伴う口腔環境の変化に対応し口腔環境の改善に貢献すると期待される。

研究目的

加齢に伴い口腔内環境は徐々に変化するが、その環境悪化を促進する因子として口腔内細菌の影響が考えられる。歯科の二大疾患であるう蝕と歯周病も、共に口腔内微生物によって起こる感染症である。デンタルプラークすなわち口腔バイオフィームは、複雑な細菌間相互作用によって作られ、さまざまな菌由来の病原因子を有する。界面機能性ガラス surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) はデンタルプラークに強い歯科材料として注目されており、これまでに S-PRG 配合レジン抗プラーク作用や、S-PRG 含有根管充填剤の抗菌作用が報告されている。その有効因子のひとつとして、S-PRG のイオン徐放性が示唆されている。S-PRG はフッ素、ホウ素、ストロンチウム等様々なイオンを放出することが知られており、細菌の生物活性に影響をおよぼしていると考えられる。

本研究では細菌の病原性を S-PRG で抑制することを検討した。主な目的は以下の通りである。

1. *P. gingivalis* のプロテアーゼ活性に対する作用

歯周病原性細菌 *P. gingivalis* が産生するプロテアーゼは、本菌の最も重要な病原因子である。本菌のプロテアーゼ活性に対する S-PRG 溶出液の影響を調べた。

2. *P. gingivalis* のゼラチン分解活性に対する作用

ゼラチン分解能は歯周組織の破壊に重要であるが、歯質に対しては修復物の脱離を促進する因子として作用する。本研究では *P. gingivalis* のゼラチン分解活性に及ぼす S-PRG 溶出液の影響を調べた。

3. *P. gingivalis* と *Fusobacterium nucleatum* の共凝集に対する作用

共凝集は細菌の組織への定着を促進する因子として重要である。主要な歯周病原性細菌同士の凝集に及ぼす S-PRG 溶出液の影響を調べた。

4. β -ガラクトシダーゼに対する作用

β -ガラクトシダーゼは、グラム陽性球菌のグリコシダーゼのひとつで、菌の定着や細胞侵入に関与し、肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae* においては病原性のひとつとしても重要である。口腔内細菌では、*S. salivarius*, *S. mitis*, *S. gordonii* などの歯面初期付着細菌やう蝕原因菌である *S. mutans* に本酵素活性があることが知られている。本研究では、*Escherichia coli* 由来の β -ガラクトシダーゼを利用して、S-PRG 溶出液の影響を調べた。

5. 口腔バイオフィーム形成に対する作用

口腔バイオフィーム形成の初期段階に関係する細菌について、ペリクルへの付着に対する S-PRG 溶出液の影響を調べた。また、唾液中の細菌によるバイオフィーム形成の抑制やすでに形成されたバイオフィームの破壊能力についても検討を加えた。

方法

1. S-PRG 溶出液の作成 (株式会社 松風)。

S-PRG フィラーを蒸留水中で 24 時間攪拌後、遠心、濾過により水溶性成分を回収。本 lot の状態は下記の通りである。pH7.3、Al: 1.5ppm, B: 890.5ppm, Na: 368.2ppm, Si: 6.0ppm, Sr: 78.4ppm, F: 105.0ppm

2. *P. gingivalis* のプロテアーゼに対する作用

P. gingivalis ATCC 33277 株を超音波破碎し、遠心後の上清をプロテアーゼサンプル (P.g SE) とした。酵素活性は、Bz-Arg-pNA 塩酸塩 (BAPNA) を基質に用いた発色反応により評価した。反応液の組成は、1 mM BAPNA, 0.2 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM L-cysteine, 1/10 P.g SE, distilled water (dw) or S-PRG 溶出液である。S-PRG を添加した場合としない場合で、5 分ごとに 30 分間、吸光度の変化を調べた。

3. *P. gingivalis* のゼラチン分解活性に対する作用

P.g SE に dw または S-PRG 溶出液を加え段階希釈した。ゼラチンコーティングしたエックス線フィルム (Kodak Ultraspeed) に 20 μ l ずつスポットし、湿度 100%の状態 で 37°C、2 時間インキュベートした。フィルムを流水下で水洗後、スポットした表面が剥離した場合をゼラチン分解活性ありと判定した。

4. *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の共凝集に対する作用

P. gingivalis ATCC 33277 株と *F. nucleatum* ATC25586 株を液体培養し共凝集バッファーで洗浄した。dw または S-PRG 溶出液で希釈した共凝集バッファーに懸濁し両者を混合した。凝集結果の判定は S.A.Kinder らの方法に準じて肉眼で行った。

5. β -ガラクトシダーゼに対する作用

E. coli 由来 β -ガラクトシダーゼを利用し、*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質に用いた発色反応で吸光度を測定した。反応液の 10%あるいは 50%を S-PRG 溶出液に置換し、反応直後と反応 1 時間後に吸光度測定を行った。対照群として、S-PRG 溶出液を dw に置換した反応液と標準曲線作製の最適緩衝液を使用した反応液を用いた。

6. 口腔バイオフィーム形成に対する作用

S. mutans JCM 5705 株、*Enterococcus faecium* WB 2000 株について、96 穴マイクロプレートを利用したプラーク形成実験を行った。唾液で表面処理したウェルに、吸光度 $OD_{660} = 1$ に調製した細菌を 20 μ l と段階希釈した S-PRG 溶出液を含む培地を 160 μ l を添加し、37°C で 16 時間嫌気培養した。浮遊細菌を除去し、洗浄・乾燥後、0.25% safranin で染色し吸光度を測定した。また唾液中の細菌によるバイオフィームについても検討を加えた。健常人 5 人の安静時唾液を混合したものを唾液サンプルとして使用し、上記と同様にバイオフィームを観察した。形成されたバイオフィームの破壊実験は下記の通り行った。唾液バイオフィームが形成されたマイクロプレートに S-PRG 溶出液を加え 37°C で 24 時間嫌気培養、上清を除去したのち吸光度を測定した。

結果と考察

1. *P. gingivalis* のプロテアーゼに対する作用

図 1 に、0.05 g の *P. gingivalis* ATCC 33277 株より調製したプロテアーゼの反応を示す。S-PRG 溶出液を添加した場合は、添加しない場合に比べて反応曲線が大きく変化し、活性が抑制されている傾向がみられた (図 1)。一方、0.08~0.1 g の菌体より調製したプロテアーゼの反応では、高濃度のプロテアーゼのため 5 分後に完全反応したと思われ、S-PRG 溶出液を添加した場合と添加しない場合で違いがみられなかった (データ非表示)。また、*P. gingivalis* の 2 つの株 (ATCC33277 株、381 株 : 図 2) について同様の結果が得られた。プロテアーゼ活性抑制のメカニズムは今後検討する必要があるが、S-PRG から溶出したイオンが酵素の活性中心に作用している可能性がある。

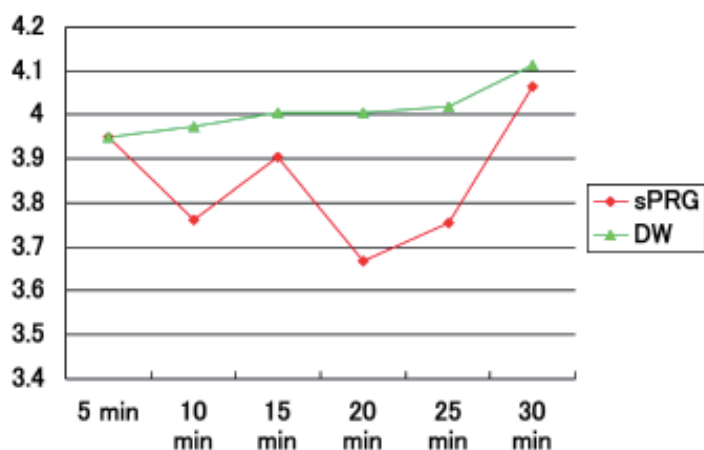
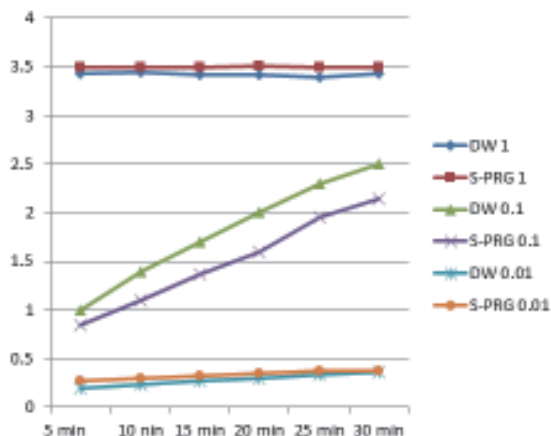


図 1. 0.05 g の *P. gingivalis* ATCC 33277 株より調製したプロテアーゼの反応

A.



B.

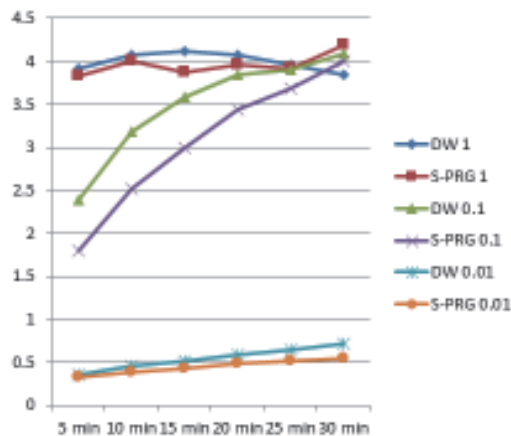


図2. *P. gingivalis* の2つの株のプロテアーゼに対する影響 (A: ATCC33277 株、B: 381 株)

3. *P. gingivalis* のゼラチン分解活性に対する作用

反応液に S-PRG 溶出液を 40%以上加えると、*P.g SE* のゼラチン分解活性が抑制された (図3)。ゼラチン分解活性は歯周組織に影響をおよぼすが、歯の修復物の脱離にも関係すると考えられている。S-PRG が歯周炎の進行予防や修復物の寿命延長にも役立つ可能性がある。

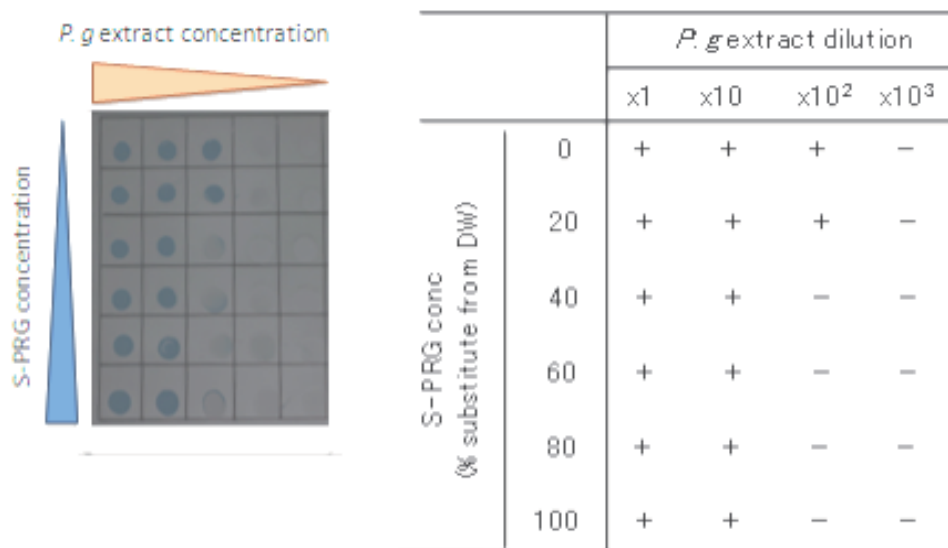


図3 (左:ゼラチンフィルムの様子 右:ゼラチン分解活性の抑制結果)

4. *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の共凝集に対する作用

共凝集バッファー希釈時に dw を S-PRG 溶出液に置換すると *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の共凝集が抑制された (図4, 5)。共凝集はバイオフィルムの成長や成熟に関係すると考えられている。S-PRG は本活性を抑制することによりプラーク付着の阻害や歯周炎の発症抑制に貢献している可能性がある。

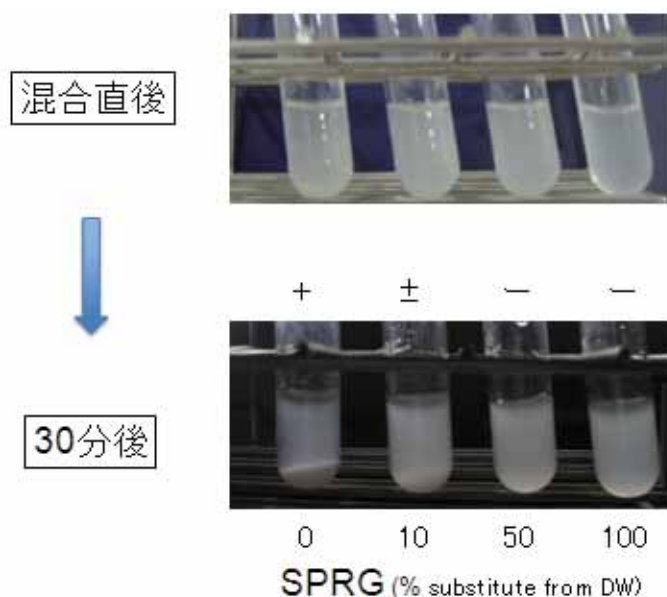


図4. 共凝集の様子

		% substitute from DW			
		0	10	50	100
Coaggregation	+	+	±	-	-

図5. S-PRG 溶出液による共凝集の抑制

5. β -ガラクトシダーゼに対する作用

図6に、反応液の50%をS-PRG溶出液で置換した反応液を段階希釈したサンプルの、反応直後(左)と1時間後(右)の結果を示す。S-PRG溶出液とdwを使用した場合は、最適緩衝液を利用した場合に比較して若干反応が弱まるが、両者の間に違いはみられなかった。10%のS-PRG溶出液を含む反応液についても同様の結果であった。S-PRG溶出液は、短時間に β -ガラクトシダーゼ活性を左右する作用はないと思われた。

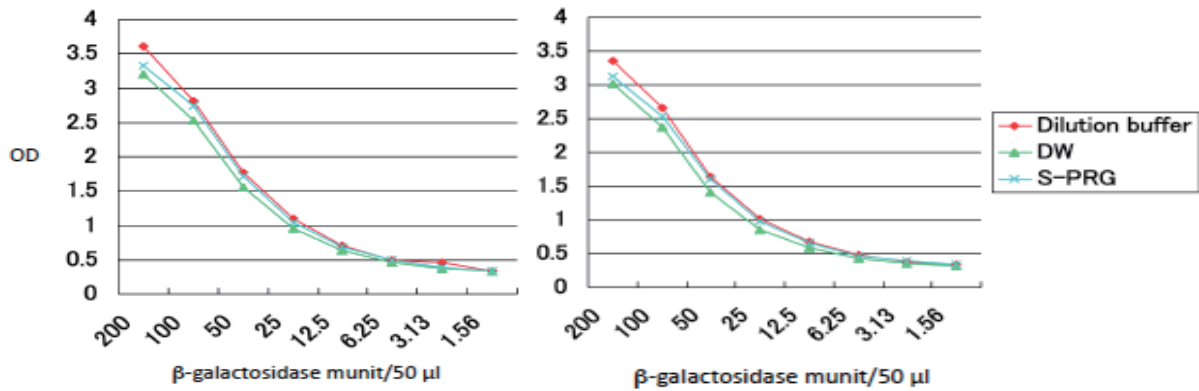


図 6 . 50% S-PRG 反応直後 (左) と 50% S-PRG 反応 1 時間後 (右)

6. 口腔バイオフィーム形成に対する作用

S. mutans JCM 5705 株 (図 7A) と *E. faecium* WB2000 株 (図 7B) で、S-PRG 溶出液添加によりバイオフィーム形成が抑制された。ただ、細菌の種類によって抑制の程度が異なったが、これは金属イオンに対する菌の感受性や結合性の特異性の違いによって現れた可能性がある。S-PRG 溶出液によるバイオフィームに対する抑制は唾液のバイオフィームにおいても認められた。S-PRG 溶出液は濃度依存的に唾液バイオフィームの形成を抑制した (図 8A)。また、S-PRG 溶出液は形成されたバイオフィームを破壊する能力を有することも明らかになった (図 8B)。S-PRG は口腔内のプラークに常に接する場所に使用されており、バイオフィーム抑制作用があることは S-PRG 含有の材料がう蝕予防や歯周疾患予防に直接役立っていると考えられる。

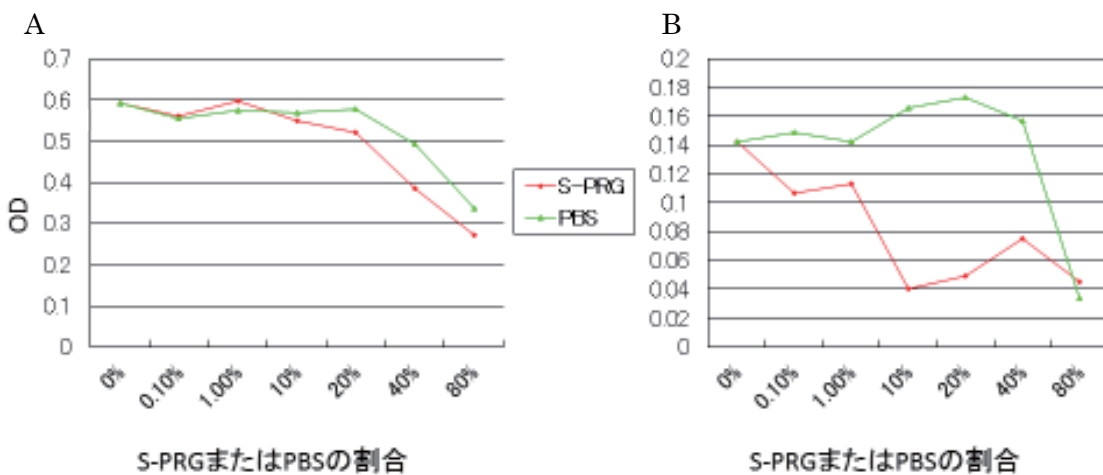


図 7. S-PRG 溶出液のバイオフィーム形成への作用。 *S. mutans* JCM 5705 (A)、 *E. faecium* WB2000 (B)。

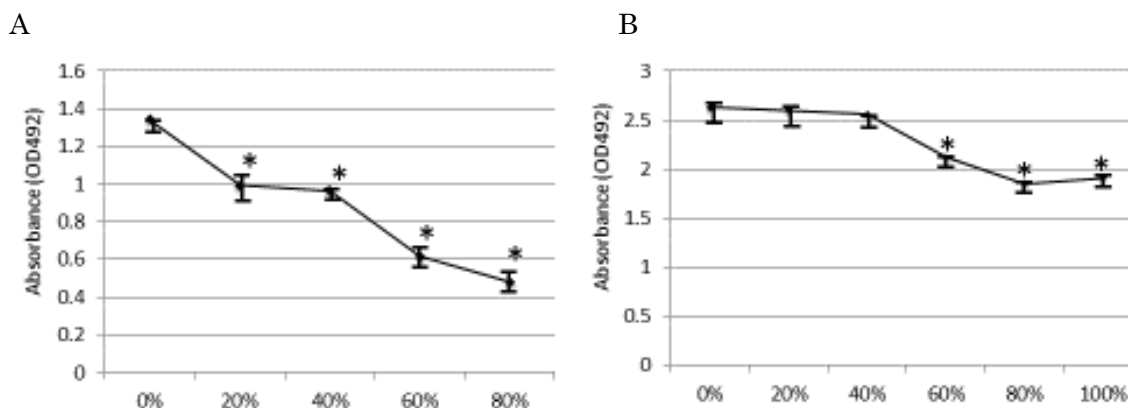


図 8. S-PRG 溶出液の唾液バイオフィームへの作用。
唾液バイオフィーム形成阻害(A)、唾液バイオフィームの破壊 (B)

結論

S-PRG 溶出液は *P. gingivalis* のプロテアーゼ活性 (BAPNA 分解活性) を抑制した。*P. gingivalis* のプロテアーゼは様々な生物活性を有し、歯周炎の発症、増悪に強く関わっている。S-PRG 溶出液による抑制メカニズムは不明であるが、プロテアーゼと金属イオンの結合を S-PRG 溶出液中の各種イオンが競合阻害している可能性が考えられる。また、S-PRG 溶出液は *P. gingivalis* のゼラチン分解活性も抑制した。ゼラチン分解活性は修復物の脱離に関係すると考えられており、S-PRG 含有材料は修復治療の長期予後を良好にすることが期待できる。また、S-PRG 溶出液は *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の共凝集も抑制した。共凝集の抑制についても S-PRG 溶出液中の各種イオンが関与している可能性がある。今後、酵素活性や共凝集の抑制メカニズムを解明する必要がある。

β -ガラクトシダーゼは菌の定着や細胞侵入に関与するだけでなく口臭の産生に関係することも知られているが今回の研究で S-PRG 溶出液による影響は認められなかった。しかし、グラム陽性菌のバイオフィーム形成に対しては S-PRG 溶出液が抑制的に働くことが明らかになった。さらに、唾液中のバイオフィームの形成阻害や破壊をする能力があることが明らかになった。

S-PRG はグラム陽性菌、グラム陰性菌の生物活性を抑制することから、う蝕や歯周炎の予防に役立つと考えられる。一方、強力な殺菌能を有しないがその分、生体に対する影響も少ないと考えられる。S-PRG は修復物や歯面研磨剤に使用されることが多く、長期的に作用することにより加齢に伴う口腔環境の悪化を防ぐ効果が期待される。今後は口臭抑制等、QOL の向上に関する影響を検討する予定である。

発表論文 (2012以降)

1. Masuo Y, Suzuki N, Yoneda M, Naito T, Hirofuji T. Salivary β -galactosidase activity affects physiological malodour. Arch Oral Biol 2012, 57(1): 87-93. 査読有
2. Discrimination of the oral microbiota associated with high hydrogen sulfide and methyl

mercaptan production. T. Takeshita, N. Suzuki, Y. Nakano, M. Yasui, M. Yoneda, Y. Shimazaki, T. Hirofuji, Y. Yamashita, SCIENTIFIC REPORTS | 2 : 215 | DOI: 10.1038/srep00215, 2012 査読有

3. Book title: Oral Health Care-Prosthodontics, Periodontology, Biology, Research and Systemic Conditions (ISBN 978-953-51-0040-9) Chapter 9: Relationship between oral malodor and oral microbiota Authors: N. Suzuki, M. Yoneda and T. Hirofuji. Edt by Mandeep Singh Viridi. In Tech (Croatia), pp 121-130, 2012
4. N. Suzuki, K. Tanabe, T. Takeshita, M. Yoneda, T. Iwamoto, S. Oshiro, Y. Yamashita, T. Hirofuji. Effects of oil drops containing *Lactobacillus salivarius* WB21 on periodontal health and oral microbiota producing volatile sulfur compounds. J Breath Res. 6 (2012) 017106 (7pp) doi:10.1088/1752-7155/6/1/017106 査読有
5. Effect of S-PRG eluate on biofilm formation and enzyme activity of oral bacteria. M. Yoneda, N. Suzuki, Y. Masuo, A. Fujimoto, K. Iha, K. Yamada, T. Iwamoto, T. Hirofuji. Int J Dent, volume 2012, article ID 814913, 6pages, doi:10.1155/2012/814913. 査読有
6. The variable etiology of oral pathologic halitosis: a case series. M. Yoneda, N. Suzuki, Sonia M. Macedo, Akie Fujimoto, Kosaku Iha, Chihiro Koga, Masaro Matsuura, Takao Hirofuji. Smile Dental Journal 7 (3): 50-56, 2012
7. Awareness among dental hygienists with regard to treatment options for halitosis. M. Yoneda, N. Kashio, H. Uchida, N. Suzuki, H. Matsuura, T. Naito, C. Koga, H. Yasukochi, M. Matsuura, T. Hirofuji. Int. J. Clin. Prev. Dent. 8 (3) 173-179, 2012
8. Effect of mouth cleaning with hinokitiol-containing gel on oral malodor: a randomized, open-label pilot study. Iha K, Suzuki N, Yoneda M, Takeshita T, Hirofuji T. Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2013;116(4):433-439. doi: 10.1016/j.oooo. 2013.05.021. Epub 2013 Aug 19. 査読有
9. *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets for the treatment of oral malodor: a double blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. Suzuki N, Yoneda M, Tanabe K, Fujimoto A, Iha K, Seno K, Yamada K, Iwamoto T, Masuo Y, Hirofuji T. Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 117: 462-469, 2014. doi:10.1016/j.oooo. 2013.12.400. 査読有
10. N. Suzuki, M. Yoneda, T. Hirofuji Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. Int. J. Dent. Volume 2013 (2013), Article ID 587279, 6 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/587279> 査読有
11. Supervised machine learning-based prediction of oral malodor based on the microbiota in saliva samples. Nakano Y, Takeshita T, Kamio N, Shiota S, Shibata Y, Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T, Yamashita Y. Art Int Med. 60: 97-101, 2014. 査読有

12. Effects of S-PRG eluate on oral biofilm and oral malodor. Suzuki N, Yoneda M, Haruna K, Masuo Y, Nishihara T, Nakanishi K, Yamada K, Fujimoto A, Hirofuji T. Arch Oral Biol. 2014 Apr;59(4):407-13. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.01.009. Epub 2014 Feb 1. 査読有

学会発表

1. S-PRG 溶出液と S-PRG 配合歯面研磨剤の口腔バイオフィルム形成への影響 榊尾陽介、鈴木奈央、米田雅裕 他 日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会 (第 137 回)、広島、2012 年 11 月
2. S-PRG 溶出液が口腔バイオフィルムと口臭に及ぼす阻害作用 春名一人、鈴木奈央、米田雅裕 他 日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会 (第 137 回)、秋田、2013 年 10 月

研究課題	酸化ヌクレオチドと遺伝情報発現異常
研究代表者	井口 八郎 (老化制御研究センター・客員教授)

要約

本研究では、酸化ヌクレオチドである 8-オキシグアニン (8-oxoG) に起因する「アンバー突然変異の読み過ごし」が高頻度に起こる大腸菌のミュータントを多数分離し解析した。その結果、分離したミュータントは、ヌクレオチド生合成に係わる遺伝子、RNA や DNA ポリメラーゼの遺伝子、膜タンパク質の遺伝子、タンパク質生合成に働く因子の遺伝子などのミュータントであることがわかった。これらの遺伝子は、例えば 8-oxoG を取り込まないように、あるいは作用しないように働いているが、ミュータントはそうした制御を許容するようになったものであると推測した。網羅的に一連のミュータントを解析することによって、酸素ストレスに対抗して働く遺伝子の発現調節機構を明らかにしようとしている。

本研究におけるミュータントの DNA 塩基配列の解析、Gmk 酵素 (guanylate kinase) の精製および反応測定等は伊東理世子博士 (福岡歯大・機能生物化学講座)、ミュータント株からの RNA ポリメラーゼの精製と反応測定など生化学的実験は関口猛博士 (九大院・医・分子生物学教室) との共同研究による。

研究目的

酸化ヌクレオチドの 8-oxoG が DNA に取り込まれると高頻度で突然変異が起きる。これまでその機構に関しては詳しく研究されてきた。一方、8-oxoG は DNA だけでなく RNA にも取り込まれるが、この場合は遺伝情報の発現に異常をもたらす。最近、8-oxoG を含む RNA と疾患・老化との関連が注目され、酸化ストレスと RNA 代謝の研究が重要課題となっている。

大腸菌の *mutT* 遺伝子の欠損株では酸化ヌクレオチドの 8-オキシグアニン (8-oxoG) によって「アンバー突然変異の読み過ごし」が起こることが知られている。この現象は *in vivo* で 8-oxoG に起因する遺伝情報発現の異常を鋭敏に検知できる唯一の系である。図 1 はこの現象を説明するモデル図である。

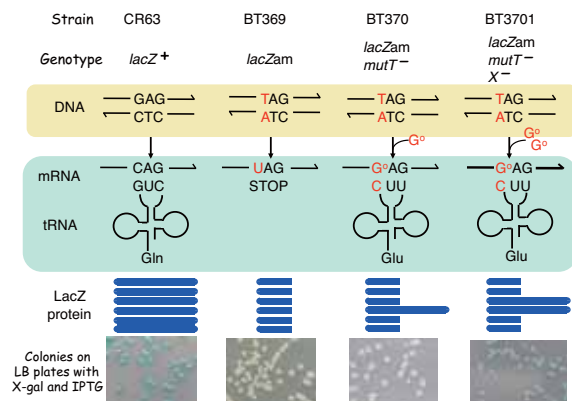


図 1 「アンバー突然変異の読み過ごし」とそれを増大させるミュータントのモデル図

本研究では、図中の X⁻ で表した新たな突然変異によって、「アンバー突然変異の読み過ごし」が増大するようなミュータント株を分離し、その遺伝子の同定・解析、および遺伝子機能の生化学的解析を行うことによって、酸化ストレスによる遺伝子発現異常を分子レベルから研究する。

方法

図 2 はミュータントの分離方法を示したものである。「アンバー突然変異の読み過ごし」が増大するような変異は必須遺伝子 (essential gene) の変異である可能性がある。その場合は欠損型ミュータントとして得ることは難しく、条件致死変異株でないと分離することができないので、実験では温度感受性 (ts) のミュータントとして分離を試みた。具体的には、バクテリア細胞自身の生育は温度感受性であるが、生育可能な低温で「アンバー突然変異の読み過ごし」が増大するミュータントは X-gal を含むプレート上で濃いブルーに呈色したコロニーを作ることによって指標にして分離した。

ミュータントの温度感受性の性質はその分離のために必要であったことに加えて、ミュータントの温度感受性の性質は野生型との相補性テストにマーカーとして用いられ、ミュータント遺伝子の同定を容易にした。図 3 はミュータント遺伝子解析の概略を示したものである。

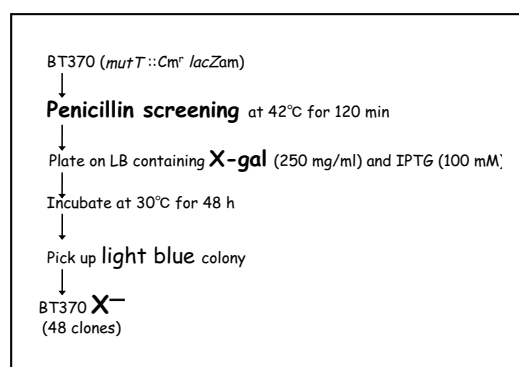


図 2 ミュータントの分離操作

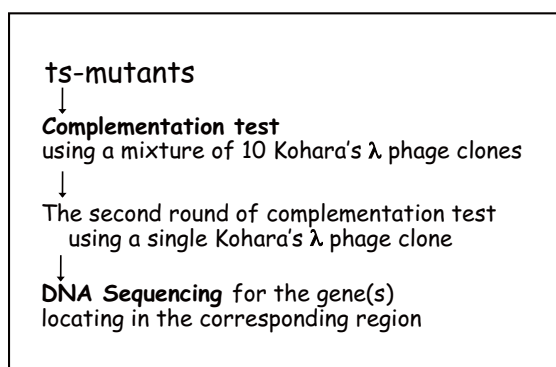


図 3 ミュータントの遺伝子解析方法の概略

結果と考察

温度感受性で、「アンバー突然変異の読み過ごし」が増大したミュータントとして 87 株のミュータントを独立に分離した。図 4 は、典型的なミュータント株で「アンバー突然変異の読み過ごし」が増大していることを β-ガラクトシダーゼ活性の測定で示したものである。「アンバー突然変異の読み過ごし」の増大、すなわち β-ガラクトシダーゼ活性の増加に酸化ストレスの 8-oxoG が関わっていることは、(1) ミュータント株にプラスミドで *mutT*⁺ 遺伝子を導入した場合、(2) 嫌気条件下で培養した場合には β-ガラクトシダーゼ活性の増加は見られなくなることで明らかである。

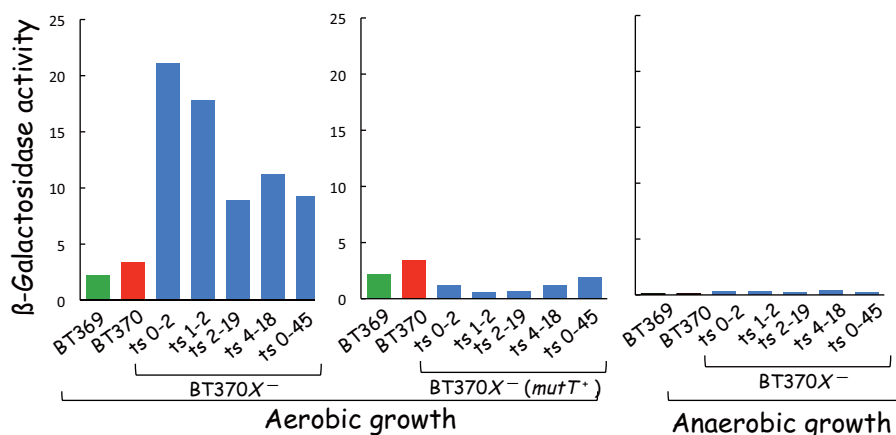


図4 ミュータントの β -ガラクトシダー

次表に、ミュータント株の変異遺伝子同定を行った結果をまとめた。

Strain	Mutant	Gene	Phage clone(s) complemented	β -galactosidase activity	Mutation	
					DNA	Protein
BT3701	ts0-2	<i>gmk</i>	571, 572	17.6	C119T	Thr40Ile
BT3704	ts0-42	<i>rpoC</i>	533	8.4	G2699A	Gly900Asp
BT3706	ts0-45	<i>rpoC</i>	533	15.5	G2699A G82A	Gly900Asp Asp28Asn
BT3707	ts1-2	<i>dnaB</i>	636	13.6	G1135A	Val379Met
BT3714	ts2-19	<i>msbA</i>	217	6.6	G808A	Ala270Thr
BT3722	ts4-5	<i>rpoC</i>	533	9.9	G3760A	Glu1254Lys
BT3728	ts4-18	<i>dnaN</i>	565	10.6	G470A	Gly157Asp
BT3750	Rif ^r -3	<i>rpoB</i>	—	15.0	A1538C	Gln513Pro
BT3723	ts4-7	<i>prfB</i>	467, 468	14.1	T397G	Ser133Ala
BT3749	ts12-7	<i>prfA</i>	247, 248	20.9	T275G	Leu92Arg
BT3750	ts12-9	<i>prfA</i>	247, 248	15.1	T275G	Leu92Arg
BT3751	ts12-14	<i>prfA</i>	247, 248	17.4	T275G	Leu92Arg
BT3752	ts12-21	<i>prfA</i>	247, 248	19.7	T275G	Leu92Arg
BT3753	ts12-24	<i>prfA</i>	247, 248	19.9	T275G	Leu92Arg
BT3755	ts12-29	<i>prfA</i>	247, 248	20.0	T275G	Leu92Arg
BT3756	ts12-30	<i>prfA</i>	247, 248	21.3	T275G	Leu92Arg

1) GMK ミュータント

ミュータント ts 0-2 は guanylate kinase の遺伝子 (*gmk*) に変異が見出された。*in vitro* mutagenesis により、この遺伝子の 119 番目の塩基を人工的に変えた場合、確かに「アンバー突然変異の読み過ごし」が増大する表現型を観察出来たことから、この酵素の変異が「アンバー突然変異の読み過ごし」の増大に係わっていることは明らかとなった。Gmk 酵素は GMP→GDP のリン酸化を触媒するが 8-oxoGMP のリン酸化はできない。ミュータント Gmk 酵素は基質特異性が緩くなって 8-oxoGDP を生成し、8-oxoGTP を経て mRNA に取り込まれる。その結果 8-oxoG を含むアンバーコドンが増大することになり、それに伴

って「読み過ごし」が増大すると推測される。*In vitro*の実験として、ミュータント Gmk を濃縮・精製し、酵素活性を調べた。ミュータント Gmk は低温下でも野生型 Gmk に比べて著しく活性が低かった。基質特異性も調べたが、8-oxoGMP→8-oxoGDP のリン酸化は確認できなかった。ミュータント Gmk は不安定で、酵素活性がわずかしがなく、更に基質特異性の変化は低レベルのものであるとすれば、*in vitro*での確認は難しいかもしれない。

2) RNA ポリメラーゼのミュータント

ミュータント ts0-42, ts0-45, ts4-5 の3株はRNAポリメラーゼのβ'サブユニットの遺伝子、*rpoC*のミュータントであることが判明した。これまでの*in vitro*の研究で、RNAポリメラーゼの基質としてGTPと8-oxoGTPを比較した場合、8-oxoGTPのRNAへの取り込みはGTPのおよそ15%に過ぎないことが知られている。本実験で得られた*rpoC*のミュータントは、基質特異性が緩くなったもので、8-oxoGTPであってもmRNAに多く取り込まれるとすれば「アンバー突然変異の読み過ごし」の増大が説明できる。実際にミュータントからRNAポリメラーゼを抽出・精製し、基質利用の効率を³²Pで標識したGTPと8-oxoGTPを用いて調べてみた。残念ながら結果はネガティブで、ミュータント酵素では8-oxoGTPがmRNAに余計に取り込まれるといった結果は得られなかった。Gmk酵素と場合と同様に、*in vivo*と*in vitro*での実験のギャップを如何にして埋めるかは残された難しい課題である。

RNAポリメラーゼβサブユニットの遺伝子(*rpoB*)の変異で「アンバー突然変異の読み過ごし」の増大がみられるミュータントの分離を試み、これに成功した。抗生物質のリファンピシンはRNAポリメラーゼの阻害剤であり、この薬剤耐性の変異(*rif^R*)は*rpoB*遺伝子に落ちることが知られていたため、リファンピシン耐性でX-galプレート上で濃いブルーのコロニーを作るものを選別した。独立に分離したミュータントの*Rif^R-2*, *Rif^R-3*, *Rif^R-4*の3株は、DNA塩基配列の解析結果から、*rpoB*遺伝子の1538位の塩基A→Cの塩基置換で、RpoBタンパク質513位のGln→Proの変化であり、3株とも同じ変異であることが判明した。RNAポリメラーゼの立体構造が解かってきているが、本研究で得られたミュータントの変異位置を立体構造上に特定してみると、それはNTPの重合化の際の「忠実度」に係わる活性部位にあることがわかった。正常なRNAポリメラーゼは基質(4種のNTP)の厳しい選択性(忠実度)を有するが、今回得たミュータントではこの選択性(忠実度)が少し緩んで、8-oxoGTPを取り込んだmRNAを多く合成するため、「アンバー突然変異の読み過ごし」の増大が起きると推察される。

3) DNA合成関連の遺伝子と膜タンパク質関連の遺伝子のミュータント

ts1-2とts4-18は*dnaB*, *dnaN*のDNA合成関連の遺伝子に、ts2-19は*msbA*の膜タンパク質の遺伝子のミュータントであることがDNA塩基配列の決定より判明した。*dnaB*は複製DNAヘリカーゼを、*dnaN*はDNAポリメラーゼIIIのβ-サブユニットをコードし

ている。「アンバー突然変異の読み過ぎの増大」が起きるのは RNA に 8-oxoG が取り込まれることが直接の原因である。考えるが、ミュータントの分離・解析の本研究で、*in vivo* では DNA 合成に関わる遺伝子が RNA 合成に働いていることを明確に示唆している。どのような機構が働いているのかは不明である。*msbA* は ATP-binding transport タンパク質をコードしているが、RNA 合成と DNA 合成はそれぞれ別に行われるのではなく、膜構造を介して一つの巨大な顆粒(ヌクレオソーム)として作用しているのではないかと推測される。構成成分である DNA 合成関連遺伝子産物や場を提供する膜タンパク質の変異によって、RNA ポリメラーゼの忠実度が影響された結果が 8-oxoG に起因する「アンバー突然変異の読み過ぎ」に繋がるものと考えている。

4) タンパク質合成に関わる因子のミュータント

ts12-7 から ts12-30 のミュータントは *prfA* 遺伝子に、ts4-7 は *prfB* 遺伝子に変異が見出された。*prfA/B* は polypeptide releasing factor をコードしている。Prf タンパク質因子はストップ・コドンを認識して、伸張が停止状態にあるペプチド鎖をリボソームより解離させる働きをする因子である。今回見出したこのミュータントは高温ではその機能が低下するため、リボソームより 8-oxoG を含むアンバーコドンでペプチド鎖を解離させるのが遅れて、その間に「読み過ぎ」が起きるのであろうと推測している。*mutT* 遺伝子の導入や嫌気条件での培養では「読み過ぎ」は見られなくなることから、アンバーコドンに含まれる 8-oxoG を厳密に認識して生ずる現象であることは間違えない。独立に分離した 7 株全部が同じサイトで同じ変異をもつことは Prf タンパク質因子とコドンの厳密な分子認識の存在を意味するものと考えられる。

今後の研究展開

ミュータントを網羅的に分離・解析することにより、酸化ストレスの 8-oxoG が関係する遺伝子を洗い出すことができた。それらを分類してみると、1) ヌクレオチド・プールに関するもの、2) RNA ポリメラーゼの忠実度に関するもの (DNA 合成に関するタンパク質や膜タンパク質を含むヌクレオソームを視野に入れて) 3) 翻訳段階でのミュータントに大別される。この他に 4) として、8-oxoG を含む mRNA の分解や修復といったレベルでのミュータントが考えられるが、まだ分離・解析に至っていない。これにはこれまでの分離方法では操作的に、感度的に不十分のため、新たな分離のための系を構築する必要がある。最近これに挑戦し、リボソーム RNA に 8-oxoG が取り込まれて生じる薬剤耐性の性質を巧みに利用する系を開発した。すなわち 8-oxoG が RNA に取り込まれるとストレプトマイシンに感受性になり、*mutT* 遺伝子導入あるいは嫌気条件では耐性になるミュータントを使う系である。たとえばヒトの cDNA ライブラリーなどを導入し耐性になるものを単離・解析

すれば、*mutT* に関連する遺伝子を鋭敏に且つ効率よく得ることが出来ると考えて研究を進めている。

発表論文

1. Search for Protein Required for Accurate Gene Expression under Oxidative Stress. Roles of Guanylate Kinase and RNA Polymerase. H. Inokuchi, R. Ito, T. Sekiguchi, and M. Sekiguchi. *J. Biol. Chem.*, **288**, No. 46, 32952-32962, November 15, 2013.

学会発表

1. 酸素ストレス下の遺伝子発現機構。井口八郎、伊東理世子、関口猛、関口睦夫 日本遺伝学会第85回大会、横浜、2013年9月。
2. 大腸菌における8-オキソグアニンを含むヌクレオチドの排除機構。伊東理世子、井口八郎、関口猛、関口睦夫 日本遺伝学会第85回大会、横浜、2013年9月。