

福岡歯科大学
戦略的研究の最初の2年間（2008～2009年）における
公募研究の課題と計画

日時 2009年4月18日（土） 午後1時～5時30分
 場所 本館8階 801講義室

プログラム

- | | | |
|-----------|---|--------|
| | 座長 中山 宏明 | |
| 1:00～1:15 | 腎不全におけるヒト過形成副甲状腺の細胞形質変化に対するDNA methylationの関与の検討 | 徳本 正憲 |
| 1:15～1:30 | DDSによる低侵襲性薬物療法の開発— γ PGAを『創剤』の素材として— | 上西 秀則 |
| 1:30～1:45 | 酸化損傷ヌクレオチドを排除する酵素群の遺伝的解析 | 高木 康光 |
| 1:45～2:00 | 咬合性外傷による顎骨吸収におけるケモカインの動態 | 後藤 加寿子 |
| | 座長 鴻江 俊治 | |
| 2:00～2:15 | ミニ移植法による口腔がんの抑制 | 大野 純 |
| 2:15～2:30 | 過剰咬合モデル動物における歯根膜細胞外基質の動態 | 都築 尊 |
| 2:30～2:45 | 病原性真菌カンジダのクオラムセンシング分子の受容系、排出系の探索 | 長 環 |
| 2:45～3:00 | エリスロポエチンの組織保護作用、抗酸化作用について | 前田 大登 |
| | 座長 谷口 邦久 | |
| 3:00～3:15 | イオンエッチング免疫電顕法による生活習慣病時唾液分泌機構の解明 | 八尋 純子 |
| 3:15～3:30 | 特異抗体標識化カーボンナノチューブによる体内動態解析用マーカーの開発 | 川口 稔 |
| 3:30～3:45 | 歯周靭帯のホメオスタチスにおけるGrowth/ Differentiation Factor-5 (GDF-5)の細胞外基質産生制御および分解酵素産生制御に対する検討 | 畠山 雄次 |
| 3:45～4:00 | 歯根膜細胞におけるSOCS-3の発現と機能 | 福島 晶絵 |
| | 座長 岡部 幸司 | |
| 4:00～4:15 | 歯根膜オキシタラン線維の形成機構 | 敦賀 英知 |
| 4:15～4:30 | 口腔細菌のゲノム解析 | 永井 淳 |
| 4:30～4:45 | SCCA発現亢進/抑制による口腔扁平上皮癌細胞の形質変化の解析 | 橋本 憲一郎 |
| | 座長 関口 睦夫 | |
| 4:45～5:00 | ATP受容体とCl ⁻ イオンチャネル連携による唾液分泌・再吸収の統合制御系 | 石橋 一成 |
| 5:00～5:15 | 破骨細胞酸分泌輸送体の調節分子探索 | 鍛冶屋 浩 |
| 5:15～5:30 | 酸性環境下で活性化される破骨細胞の陰イオンチャネルの同定と機能の解明 | 岡本 富士雄 |

研究者名 徳本 正憲

研究課題 腎不全におけるヒト過形成副甲状腺の細胞形質変化に対する DNA methylation の関与の検討

研究計画

近年、我が国では慢性腎疾患（CKD）患者が増加してきている。CKD 患者では、我が国の死亡原因上位 1－3 位の悪性腫瘍や心・脳血管疾患の合併が多いだけでなく、CKD が進行すると、血液透析を中心とした血液浄化療法を必要とする末期腎不全に至る。この CKD、特に末期腎不全、およびその合併症による入院の増加は我が国の医療経済を圧迫しており、CKD およびその合併症の原因および治療法の解明は急務である。CKD では、CKD の final common pathway である腎間質線維化に寄与する腎尿細管の Epithelial-mesenchymal transition、血管石灰化における血管平滑筋細胞の骨芽細胞様変化、二次性副甲状腺機能亢進症（SHPT）の副甲状腺（PTG）における過形成様式の変化等、細胞の形質変化がその病態に強く関与している。これまで、我々は SHPT におけるびまん性過形成から結節性過形成への形質変化を中心に研究してきた（Tokumoto et al, *Kidney Int*, 2002）。そして、近年、過形成 PTG が結節性過形成に至ると、腎移植によって腎不全を正常化しても、低下した vitamin D receptor（VDR）、calcium sensing receptor（CaR）の発現は回復しないことを報告した（Taniguchi et al, *Kidney Int*, 2006）。このことは、SHPT の結節性過形成で genetic な変化が起きている可能性を示唆するが、これまでの報告では、VDR, CaR に genetic な変化は認められていない（Brown et al, *J Clin Endocrinol Metab*, 2000）。

近年、悪性腫瘍の細胞形質変化に DNA methylation を中心とした epigenetic な変化が関与することが明らかとなってきた。この epigenetic な変化が CKD およびその合併症の発症・進展に寄与するという仮説を立てた。vitamin D（VD）誘導体の投与により CRF 患者の mortality が改善するという報告があるため、特に腎不全における VD 抵抗性と epigenetic silencing の関係に着目している。これまでにこのような検討はなく、我々はまず SHPT の PTG を用いてこの仮説の正当性を証明しようと試みてきた。まず、SHPT で摘出された慢性腎不全（CRF）患者の初代ヒト PTG 培養細胞に対し、epigenetic な変化を改善する治療薬の一つである Histone deacetylase inhibitor（HDAI）、あるいは VD を単独または併用で投与し、その効果を比較検討した。各単独投与群に比べて併用投与群が、低下している VDR, CaR, p21, p27 の発現をより回復することを明らかにした。さらに、5/6 腎摘 CRF ラットでも、各単独治療に比べて VD と HDAI の併用治療が SHPT を改善することを明らかにした（論文執筆中）。これらの結果は HDAI が過形成 PTG における VD 抵抗性を改善し、SHPT の新たな治療となりうることを示唆しているが、severe な結節性過形成では DNA methylation を除去する 5-aza-2'-deoxycytidine の投与が必要となる可能性がある。今後、ヒト摘出過形成 PTG を用い、VD によって発現が調節される VDR, CaR, p21, p27 の mRNA、蛋白発現量とこれらの promoter における DNA methylation の程度の間関係を、びまん性過形成と結節性過形成で比較検討する。

研究者名 上西 秀則

研究課題 DDSによる低侵襲性薬物療法の開発— γ PGAを『創剤』の素材として—

研究計画

Drug Delivery System(DDS)は『必要な場所』に『必要な量』を『必要な時』に薬物を送達することを可能にする方法で、現行の薬物療法のパラダイムから脱皮しうる優れた方法として注目されている。とりわけ、がんの薬物療法における深刻な副作用からの解放を可能にするDDSは患者のQOLを高めるとともに、治療効果の著しい向上が期待できる。一方、DDSを効果的なものにするためには、優れた薬物搬送体の開発は不可欠で、様々な素材が検討されている。

申請者は *Bacillus subtilis* が産生するポリガンマグルタミン酸(γ PGA)に着目し、これがナノサイズのカプセル作成素材として利用可能であることを見出したので、DDSにおける薬物搬送体として γ PGAの応用が可能であることの実証を目的として研究を行う。

研究期間内に以下の項目について試験を行い、 γ PGAの応用に関する基礎情報を確立させる。

- 1) γ PGAの分子量を50~60万に調整し、超音波処理により粒子径がおよそ350nmのナノカプセルを作成してこれに薬物を封入させる。薬物としては抗がん剤の一種であるドキソルビシンを使用する。
- 2) 担がん動物(マウス)に対するナノカプセル内包抗がん剤による治療効果を確認し、DDSにおける薬物搬送体として γ PGAが有効であることを実証する。マウスへ移植可能な腫瘍としては、Sarcoma 180、乳がんおよび結腸がんを使用することを計画している。ナノカプセルの腫瘍組織への選択的な移行については、凍結病理標本を作製して蛍光顕微鏡による病理組織学的な検索を行う。なお、病理組織学的検索のため、本学谷口邦久教授と一部において共同研究を行う。
- 3) ドキソルビシン以外に γ PGAと結合可能な薬物(抗がん剤および抗菌薬)のスクリーニングを行い、ナノカプセルに封入した薬剤を『創剤』する。

以上の項目を2年間で完結する予定である

研究者名 高木 康光

研究課題 酸化損傷ヌクレオチドを排除する酵素群の遺伝的解析

研究計画

X線や γ 線に代表される低LET放射線により発生する種々のフリーラジカルやイオンは、DNAを酸化損傷する。このような環境因子がもたらすゲノムへの間接作用を解明するモデル実験として、酸化ストレスを誘導する種々の薬剤を培養細胞に対して処理し、生じる突然変異や細胞死を解析する。強い変異原性を持つ酸化型ヌクレオチド8-oxo-dGTPを分解する酵素群

(MutT遺伝子族)は、類似の活性を持ちつつ酸化ストレスに応答する多様な細胞機能に関わると考えられるので、これら酵素を中心に研究する。

突然変異や細胞死は多数の因子が関与する複雑な反応系なので、研究対象とする分子を遺伝学的手法で除いた細胞や個体を用いた実験系が有用であり、特に相同組換えを利用したマウス遺伝子欠損技術は、我々を含めて多くの研究グループが利用してきた。しかし、この技術は、ES細胞レベルでの遺伝子破壊効率や遺伝子改変動物の作成効率、更にその後に必要なマウスの交配等を考慮すると、現在でもかなり大掛かりで時間のかかるシステムである。

そこで、これらの欠点を補う特色を持つ「ニワトリBリンパ球由来のDT40細胞を用いた遺伝子破壊系」を用いて研究を進める。このシステムでは、免疫グロブリン遺伝子の再構成の際に誘導される高い相同組換え活性を利用して、マウスES細胞よりも2桁ほど効率よく標的遺伝子を不活化でき、さらに複数個の遺伝子に変異した細胞を、個体のかけ合わせなしで効率よく樹立することが可能なので、MutT遺伝子族が相互に示す作用を、迅速かつ精緻に解析することが可能である。

これまでに同定したMutT酵素群の中で、MTH2には強い活性を示す基質が見出されておらず、突然変異抑制活性も他の同族酵素よりも低かったので、その詳細な機能は不明である。そこで平成20～21年度においては、本遺伝子をDT40細胞を用いた遺伝子破壊実験の標的とする。まず、ニワトリMth2遺伝子をバイオインフォマティクス的手法で同定し、クローン化する。次に、同定した遺伝子を用いた相同組換え反応によりMth2欠損DT40細胞を樹立する。得られた欠損細胞の突然変異や細胞死を野生型細胞のそれらと比較する事により、MTH2蛋白質の機能を解析する。

研究計画 C4

研究者名 後藤 加寿子

研究課題 咬合性外傷による顎骨吸収におけるケモカインの動態

研究計画

本研究は咬合性外傷における顎骨状態の診断及び新しい治療法探索への最初のステップとして、マウスを用いて歯に過剰な咬合力が加わる *in vivo* 咬合性外傷モデルを確立して歯槽骨及び歯周組織における形態的、免疫化学的な解析を骨リモデリングに関連する調節因子、特に歯槽骨の吸収促進因子を探索する。

私は、これまでの研究で炎症性関節炎モデルであるラットアジュバント関節炎において MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 α) は骨髄細胞内の破骨前駆細胞や成熟破骨細胞を脛骨骨幹部から遠位端へ移動させる走化性因子として作用すると同時に RANKL の発現誘導を介して破骨細胞分化・誘導因子として作用する可能性があることを見出した (Toh K *et. al.*, 2004)。

本研究では、これまでの基礎的研究の知識とテクニックと共に分子生物学的技術や知識及び遺伝子改変動物を用いた解析法を新たに修得して過剰な咬合力によるメカニカルストレスに対する顎骨吸収に関与するケモカインの動態を特定し、咬合性外傷を生化学的側面から解析して、最終的には臨床における顎骨吸収抑制のための方法の一つの応用へ結びつけることを目的とする。現在までにその予備実験として数回ワイヤーを歯科用スーパーボンドで接着させ、その装着具合やマウス自身の体重変化などを観察しているが実験期間中に関しては支障ないようである。初年度はこの詳細な条件設定及び顎骨の形態的、免疫学的解析を中心に行う。免疫学的解析に関しては顎骨リモデリングに関連する調節因子、特に歯槽骨の吸収促進因子を探索する。

公募研究 C5

研究者名 大野 純

研究課題 ミニ移植法による口腔がんの抑制

研究計画

ミニ移植法は、アロ移植の合併症として生じる移植片対宿主病（GVHD）の免疫反応を応用して、抗腫瘍免疫反応である移植片対腫瘍（GVT）効果を利用するものである。そこで、口腔がん動物モデルにミニ移植法を施し、GVTによるがん抑制効果の誘導機序の解明を試みる。

（1）ミニ移植法によるGVT効果の誘導：(C57BL/6 x DBA2)F1 マウス舌に B16（メラノーマ）細胞を播種して、口腔メラノーマ・担がんモデルを作製する。担がん・モデルへのミニ移植法の応用は、同モデルに C57BL/6 脾細胞を投与して全身性の急性GVHDを併発させる。GVT効果は、口腔メラノーマ結節の増大率および頸部リンパ節転移率により判定する。

（2）GVT効果に関与するエフェクター細胞の同定：GVTエフェクター細胞とGVHDエフェクター細胞を単離し、両者の性状を比較検討する。単離された細胞を用いて、メラノーマ細胞との相互作用（遊走能および接着能など）を *in vitro* 系により検索する。

（3）（1）、（2）の結果から、担がんモデル作製前にエフェクター細胞をリンパ節に導入して、頸部リンパ節転移予防法の確立を試みる。

公募研究 C6

研究者名 都築 尊

研究課題 過剰咬合モデル動物における歯根膜細胞外基質の動態

研究計画

本研究の目的は、義歯の鈎歯になる歯の歯根膜を長期にわたり強化、安定させる方法を確立することである。12型コラーゲンは、歯根膜組織において、主線維である1型、3型コラーゲンに次いで豊富に存在し、*in vitro*において、歯根膜線維芽細胞はメカニカルストレス環境下で12型コラーゲンを発現する。したがって12型コラーゲンが歯根膜のリモデリングに関わっているとの仮説を検証するため、以下の研究を行う。

① 2年間の研究計画

過剰咬合モデルマウスを確立し、歯根膜構成成分である12型コラーゲンの量的変化を観察する。また、老化促進モデルマウスを用いて、老化と歯根膜構成成分との関係を調べ、さらに過剰咬合を加えたときの12型コラーゲンの発現を調べる。

② 現在までの研究状況

8週齢♀ウイスターラットの上顎右側臼歯に、0.8mmコバルトクロムクラスプ線をスーパーボンドにて接着し、過剰咬合モデルを製作した。組織学的に観察を行なったところ、コントロールに比べ、4日目より臼歯の分岐部にTRAP陽性細胞の有意な出現を確認した。つづいて、5週齢ddYマウスの歯を抜歯し、歯根膜を採取後リアルタイムPCRにて線維結合型コラーゲンの発現を調べたところ、12型コラーゲンの発現を確認した。現在過剰咬合モデル歯根膜にて検討中である。

研究者名 長 環

研究課題 病原性真菌カンジダのクオラムセンシング分子の受容系、排出系の探索

研究計画

微生物が一定環境中の自身の菌密度を感知する機構をクオラムセンシング(QS)といい、病原性発現と密接な関係をもつ。病原性真菌 *Candida albicans* の QS 分子の一つはテルペン/ステロール合成系の間接物質 farnesol であることがわかっているが、QS 機構はまだ殆ど解明されていない。そこで、QS 機構の出発点となる QS 分子の受容系、排出系の解明を行う。

- (1) 受容系の探索：これまでの実験で *C. albicans* は QS 刺激により一時的な飢餓、酸化ストレス応答状態に陥ることがわかった。一方 QS 分子によるシグナルが二成分制御系因子に含まれる Chk1 に伝達されていることが報告されている。また最近の予備実験で Chk1 と MAPK 系アクチベーター Sho1 が、酸化、浸透圧ストレス下でシグナル伝達の相関を示した。これらのことから、Sho1 が QS 分子の受容体となる可能性も考えられるため、yeast two-hybrid 法を用いて Chk1、Sho1 それぞれの蛋白と相互作用を示す蛋白の遺伝子探索を行う。
- (2) 排出系の探索： *Candida* 属であるがハプロイドで分子生物学的解析が比較的容易な *C. glabrata* は、文献的に farnesol の細胞外排出はないとされている。一方ステロール合成経路途中の遺伝子欠損を起こすと farnesol は細胞外へ排出される。そこで既に保有しているステロール合成系遺伝子欠損株による細胞外 farnesol の有無を検討する。Farnesol が排出されれば、将来的にはマイクロアレイ法による排出に関わる膜蛋白遺伝子を単離する。

研究者名 前田 大登

研究課題 エリスロポエチンの組織保護作用、抗酸化作用について

研究計画

【背景】

- (1) Erythropoietin (EPO) は組織保護作用を有し、ischemia-reperfusion(I/R)モデルの臓器傷害（脳、網膜、心臓、腎臓）の減弱効果が報告されている。
- (2) EPO を使用すると、造血作用によって赤血球数が増加する。そのため EPO の直接作用ではなく貧血改善効果での間接な組織保護作用の可能性を否定できない。Carbamylated erythropoietin (CEPO)は、造血作用はないが組織保護作用を有し、高容量使用しても造血はおこらない。
- (3) 腎臓での保護効果は、PI3K/Akt pathway を介したアポトーシスの抑制や Heat shock protein 70 の増加によると報告されているが抗酸化作用が関与しているかは明らかではない。

【目的】 エリスロポエチンの組織保護作用が、抗酸化作用によるものであるかを In vivo、In Vitro において検討する。また、組織保護作用が貧血改善効果によらないことを確認するために、高容量で使用できる CEPO を用いる。

【今後の研究】

(In vitro study) ヒト尿細管細胞を培養し、antimycin A、2-deoxyglucose、calcium ionophore を用い化学的虚血再灌流障害を引き起こす。障害前より、CEPO、抗酸化薬にて Coincubate し、障害の程度、アポトーシスの量が減少するか確認する。

(In vivo study) SD ラットの左腎臓を摘出し、右腎動脈をクランプ後再灌流させることで、腎虚血再灌流モデルを作成する。CEPO または生理食塩水を虚血前に投与することで、傷害群、sham 群、CEPO 群を作成し評価する。

研究者名 八尋純子

研究課題 イオンエッチング免疫電顕法による生活習慣病時唾液分泌機構の
解明

研究計画

生活習慣病として注目される糖尿病において唾液合成量は低下する。アミラーゼ局在量の変化・減少が腺細胞のみではなく導管も含めて腺組織のどの部位に起こるのかをイオンエッチング(IE)免疫SEM法により光顕レベルの全体的分布変化、さらには同一切片で必要な部位を詳細に電顕レベルで研究する。IE免疫SEM法は局在量を数量化できるため正確な検索が可能である。

- (1) 正常な成体雄性ラット耳下腺（純漿液性大唾液腺）およびエブネル腺（純漿液性小唾液腺）におけるアミラーゼ局在量をこれまでに数量的に比較して調べ、腺房細胞では耳下腺に、導管ではエブネル腺に、より多くの局在が認められた。糖尿病成体雄性ラット耳下腺の場合でのアミラーゼ局在量・分布相違点を腺房細胞のみならず導管系特に介在部に着目して調べ、糖尿病における唾液分泌機構の変化が介在部等導管の機能や腺房細胞との関わりに如何に反映しているか考察する。
- (2) 耳下腺と存在部位が異なり粘膜中にあるエブネル腺の場合の糖尿病成体雄性ラットにおいて、正常ラットと比較して局在分布・量の変化を調べる。導管部での減少が予想される。さらに前年度糖尿病ラット耳下腺の結果と比較考察する。腺房部においては、分泌の主体である耳下腺腺房部、つぎにエブネル腺腺房部での局在密度減少が予想されるが、腺房部内、導管と腺房部との関わり方の相違点に注目して調べ、アミラーゼの分泌が腺の種類や病的状態にどのように反映するのかを明らかにする。

研究者名 川口 稔

研究課題 特異抗体標識化カーボンナノチューブによる体内動態解析用マーカーの開発

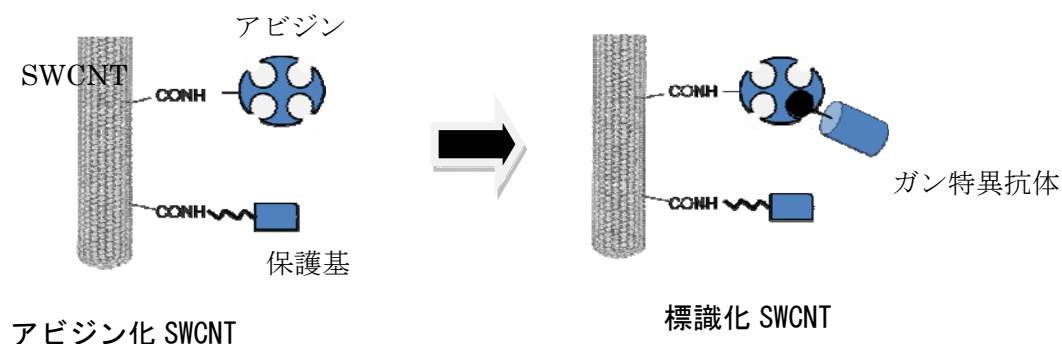
研究計画

単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は近赤外線を照射すると光熱転換反応によって発熱する。我々の研究グループはこの SWCNT にガン細胞の特異抗体を結合させた複合体を利用して、ガン組織内で標的となるガン細胞と特異的に結合して「分子ヒーター」として機能する温熱療法への応用を目指し研究を行っている (H20 年度 CREST 九州大・中嶋チーム, 福歯大グループ)。この研究の中で、ガン細胞特異抗体を結合させた SWCNT/抗体複合体の調製が重要なポイントなるが、我々は SWCNT 表層を酸化して生成させたカルボキシル基にアビジンを結合させ、このアビジンを介してビオチン化抗体を結合させる方法でブレイクスルーをはかる。

現在マウスの悪性黒色腫 B-16 の特異抗体 TRP-1 をモデルとして複合体の合成を進めているが、アビジン化 SWCNT とビオチン化抗体複合体は TRP-1 とのコンジュゲート体生成のみならず、他の抗体やペプチドとのコンジュゲート体調製に幅広く活用できる。その一方で、複合体の体内動態を知ることは生体への適用には不可欠である。そこでこのアビジン化 SWCNT を抗アビジン抗体で標識すれば、複合体の体内動態を検証できる有効なツールとすることができる。

このような点をふまえて、本研究では SWCNT へのアビジンの結合と抗アビジン抗体マーカーの結合性について、ナノレベルでの反応解析が可能な水晶発振子マイクロバランス (QCM) による解析を行い、特異抗体標識化 SWCNT の合成スキーム確立を目指す。

- (1) QCM の金薄膜センサー表面にカルボキシル化した SWCNT を固定化し、そのカルボキシル基にストレプトアビジンを結合させる。このときの共鳴振動数減衰から、アビジンと SWCNT の複合体形成の確認を行う。同様に複合体に抗 TRP-1 抗体などを反応させた SWCNT 複合体の調製と確認を行う。これら QCM 法による結果から、SWCNT 表層に生成したカルボキシル基密度とアビジンとの反応効率ならびに余剰カルボキシル基に対する保護基の種類を検討し、標識化 SWCNT の合成スキームを確立する。
- (2) 調製した標識化 SWCNT をマウスの舌に注入し、蛍光標識化抗アビジン抗体を用いて周囲組織を含めた検索を行って、組織内動態を検討する。



公募研究 C11

研究者名 畠山 雄次

研究課題 歯周靱帯のホメオスタシスにおける Growth/Differentiation Factor-5 の細胞外基質産生制御および分解酵素産生制御に関する検討。

研究計画

Growth/Differentiation Factor 5 (GDF5) は Transforming Growth Factor beta (TGF- β) スーパーファミリーのひとつで、歯根の形成過程において、歯小囊及び歯根膜細胞に遺伝子発現が認められ、細胞外基質促進に関わると考えられている。一方、歯根膜細胞には細胞外基質分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) の発現が認められている。しかし GDF5 と MMPs との関連については不明である。本研究課題は、GDF5 の歯根膜細胞における細胞外基質産生能および細胞外基質分解酵素活性能に焦点を当てて研究する。

(1) 歯根膜細胞におけるGDF5のコラーゲンおよびMMPsの遺伝子発現に関する検討
生後3週齢のマウスより得られた歯根膜細胞を培養し、リコンビナントマウスGDF5を培養液中に添加した。添加3日後、歯根膜細胞から得られたtotal RNAに対しRT-PCRを施し、代表的な細胞外基質であるtype I collagen (Col1)、および間葉系細胞によって産生されるMMP2遺伝子発現を検討した。その結果、Col1及びMMP2ともに遺伝子発現の上昇が認められた。今後、これらの遺伝子の発現パターンを培養時間及びGDF5の濃度を変えて検討する。

(2) GDF5による硬組織形成細胞のMMPs活性に関する検討

マウスより得られた歯根膜細胞は heterogenous な細胞集団であることから、GDF5はどの細胞に作用するか不明である。歯根膜細胞には硬組織形成を担う細胞が存在することから、マウス骨芽細胞株 MC3T3 における GDF5 の MMP2 活性に対する影響を検討した。その結果、GDF5 は MMP2 活性を上昇させることが、ゼラチンザイモグラフィによって認められた。今後、この MMP2 活性上昇の詳細な機序解明のために、骨芽細胞株における GDF5 の MMP2 遺伝子発現パターンを検討する。

公募研究 C12

研究者名 福島 晶絵

研究課題 歯根膜細胞における SOCS-3 の発現と機能

研究計画

Suppressor of cytokine signaling (SOCS)は主要な炎症性サイトカインシグナル伝達経路である JAK-STAT シグナル伝達系が活性化されることによって産生され、炎症性シグナルについて抑制的に働くことが知られている。しかし、歯周組織の炎症において SOCS がどのような働きをしているかは未だ明らかではない。そこで、本研究では、歯根膜細胞における SOCS の発現と機能解析を行う。

- 1) Western blotting 法、RT-PCR 法を用いて、歯根膜培養細胞を炎症性サイトカインによって刺激した場合における SOCS のタンパク質ならびに mRNA の発現について確認を行う。
- 2) 歯根膜培養細胞を炎症性サイトカインで刺激した場合に誘導される SOCS の発現が JAK-STAT 系を介しているかを確認するために、リン酸化 STAT の発現について Western blotting 法を用いて確認を行う。
- 3) 歯根膜細胞に発現誘導される SOCS の機能を調べるために、歯根膜細胞に SOCS を強制発現させた場合におけるサイトカインによって誘導される炎症性物質の発現量の変化を ELISA 法によって行う。

公募研究 C13

研究者名 敦賀 英知

研究課題 歯根膜オキシタラン線維の形成機構

研究計画

歯周組織は、細胞と細胞外基質から成り、主要細胞外線維成分としてコラーゲン、弾性系線維が知られている。これらの構成分子の産生と分解はダイナミックな調節を受けており、その代謝異常と病変は組織破壊となる。しかし、従来、歯周組織における弾性系線維の役割およびその形成・分解機構は明らかにされていなかった。歯周組織の弾性系線維は、部位局在性を有する。すなわち、歯肉にはエラスチンの沈着を伴う弾性系線維が存在するのに対し、歯根膜には主にエラスチンの沈着を伴わない弾性系線維（オキシタラン線維）が存在する。

歯根膜におけるオキシタラン線維は、歯根膜線維に直交する特徴的な配列を示すが、その機能および形成機構は明らかではない。これまで、歯根膜線維芽細胞の培養系を用いた研究により、細胞に伸展力を付与すると、オキシタラン線維が伸展軸に垂直に配列することを明らかにした。この培養系は、生体の歯根膜を疑似したものであると考えられる。

オキシタラン線維の主要構成成分として fibrillin が知られている。また、オキシタラン線維の関連分子として、fibulin-5, LTBP-2, EMILIN-1 などが報告されている。しかし、これらが、オキシタラン線維の形成過程で、どのように関与しているかの詳細な分析は行われていない。そこで今年度は、上記の培養系を用いて、これらの分子のうち、特に LTBP-2 に焦点をあてて、その機能について調べる。

（平成 19 年度学術フロンティア研究支援により、本研究で用いる培養系の確立および fibulin-5 の機能について報告済： Tsuruga E *et al.*, J Periodontal Res, 2009; Tsuruga E *et al.*, Tissue Cell, 2009; Nakashima K *et al.*, J Periodontal Res (in press)）

研究者名 永井 淳

研究課題 歯周ポケット細菌の有するミスマッチ修復酵素遺伝子群の網羅的探索

研究計画

申請者らは、歯周ポケットに生息する細菌群（歯周ポケット細菌）の 16S rRNA 遺伝子の配列解析を行い、それらのうちの 99%は、メタゲノム解析の先行する腸内細菌に含まれないユニークな細菌群であることを明らかにした。すなわち、歯周ポケット細菌は、宿主環境に適応した約 1000 種の細菌の持つ定着、増殖、共生および病原性発現に関わる遺伝子資源であり、難培養性菌種に由来する新規配列が豊富に含まれると期待される。

Helicobacter pylori をはじめとする ϵ プロテオバクテリアは、ミスマッチ修復酵素遺伝子を欠失することで、環境に適応しうるゲノムの柔軟性を獲得し生き残る戦略をとっていると考えられている。歯周ポケット細菌の多くは ϵ プロテオバクテリアではなく、新規性の高いミスマッチ修復系遺伝子を豊富に含むと期待される。そこで本研究は、歯周ポケット細菌のミスマッチ修復酵素遺伝子群の網羅的探索を行うことを目的とし、歯周ポケット細菌メタゲノムライブラリの構築ならびに配列解析を行うことを計画している。

1. 歯周ポケット細菌の染色体 DNA の抽出・精製法の最適化

1) 試料の酵素消化ならびに物理的菌体破壊の最適条件の設定：細菌細胞を破碎する方法を検討中である。

2) 染色体 DNA 精製法の最適化

2. 歯周ポケット細菌メタゲノムライブラリの作製

1) 精製染色体 DNA 中の 16S rRNA 遺伝子の多様性の検定

3. メタゲノムライブラリの解析

1) 次世代シーケンサによる配列解析

2) 歯周ポケット細菌のミスマッチ修復酵素遺伝子のホモログ探索

研究者名 橋本 憲一郎

研究課題 SCCA 発現亢進/抑制による口腔扁平上皮癌細胞の形質変化の解析

研究計画

近年、癌疾患における治療のオーダーメイド化が注目されており、分子生物学的研究は必須である。オーダーメイド化にあたり、癌細胞個別の形質究明が必要である。そのためには、①癌細胞特異的発現蛋白の同定 ②細胞内での特異的蛋白の機能検索 ③特異的蛋白のパートナー分子の同定・機能検索 ④特異的蛋白の発現調節因子 (*cis*-element、*trans*-acting factor) の検索 が重要となる。これらを解明することにより、癌細胞特異的蛋白を標的分子とした発現調節機構の確立が可能となり、癌の遺伝子治療あるいは予防に役立つものと考えられる。本研究では標的分子として、Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA) を取り扱う。SCCA は扁平上皮癌の特異的腫瘍マーカーとして使用されている。マーカーとしてだけでなく、腫瘍形成に直接的な影響を及ぼすとされ、その例として、抗癌剤、放射線などの細胞死誘導に対して抵抗性を示すことが報告されている。ただし、アイソフォーム (SCCA1、SCCA2) があり、それぞれの腫瘍形質への影響、パートナー蛋白、発現調節機構については詳細に解明されていない。そこで今回は SCCA の発現亢進系と抑制系を確立し、腫瘍形質への影響を検索することを目的とする。SCCA 発現ベクターによる発現亢進系および抑制系が及ぼす培養細胞への影響を観察し、口腔扁平上皮癌の個別化遺伝子治療開発の機転とする。

SCCA 発現ベクター導入による発現亢進系および抑制系が及ぼす培養細胞の形質変化を観察するため、遺伝子発現ベクターを導入した扁平上皮癌細胞株の恒常発現細胞株を作成する。抑制系には、RNAi 法を用いた U6 または H1 プロモーターベクターによるヘアピンループ型 siRNA 発現形式を予定。

→細胞形態、増殖能、浸潤能など腫瘍形質獲得の観察。

→サイトカイン (TNF など) や抗癌剤を用いた細胞の反応、アポトーシス誘導抵抗性などを検討。

→結果により、時間制御発現系 (テトラサイクリンによる on/off system 等) の検討を行い、SCCA の形質変化の解析を図る。

公募研究 C16

研究者名 石橋 一成

研究課題 ATP 受容体と Cl⁻ イオンチャネル連携による唾液分泌・再吸収の統合制御系

研究計画

唾液は、唾液腺終末部においてほぼ等張の原唾液として分泌され、導管を通過する際に Na、Cl⁻ イオンの再吸収がおこり、低張の唾液として口腔内に分泌される。唾液分泌のドライビング・フォースとなるのは Cl⁻ であるが、再吸収の主役となるのも Cl⁻ であり、そのイオン輸送の中心となるのが管腔側に局在する Cl⁻ チャネルである。このチャネル分子を中心にした再吸収システムが、上流で起こる唾液分泌機構との綿密な連携のもと、最終唾液の浸透圧とイオン組成を制御している可能性を探る。さらに Cl⁻ チャネルの機能破綻と細胞増殖の関係を調べる。

(1) 唾液腺腺房細胞の管腔側膜上に局在する Ca²⁺ 活性化 Cl⁻ チャネル (AN01) が、昨年 9 月に新規に発見された。その siRNA を唾液腺開口部より腺体内に逆行性注入することによる、*in vivo* 遺伝子ノックダウンを行い、AN01 がどのように唾液分泌能に関与しているかを調べる。さらに cAMP 依存性 Cl⁻ チャネル (CFTR) を特異的阻害剤で抑制して、腺房細胞の管腔側膜上に局在する両 Cl⁻ チャネルの唾液分泌における相加効果をみる。

昨年、再吸収には ATP 受容体と Cl⁻ チャネルが密接に連携していることを明らかにしたが、今回、上流で起こる唾液分泌においても ATP 受容体 (P2X₇-Re) と Cl⁻ チャネル (AN01 または CFTR) が連携している可能性を唾液成分の変化を計測することにより探索する。

(2) AN01 が変異すると消化器官に stromal tumor が発生する。β₁ 受容体を過剰刺激することによって、短期日に唾液腺腺房細胞は 10 倍に過形成、肥大化する。Cl⁻ チャネルの機能バランスが壊れることにより、分化していた細胞が増殖サイクルに復帰する為であると言われている。この現象の分子メカニズムと生理的意義を明らかにする。その為に、腺房細胞に局在する Cl⁻ チャネルや Na⁺ チャネルをノックダウンしたり、特異的阻害剤で機能を抑制したりした時に細胞内シグナル伝達系が如何なる影響を受けるか、ウエスタンブロッティング法、免疫染色法、Real-time PCR 法を駆使して検索する。

研究者名 鍛冶屋 浩

研究課題 破骨細胞酸分泌輸送体の調節分子探索

研究計画

これまでに私は破骨細胞の酸(HCl)分泌輸送体である Clc7 型 Cl⁻チャネル(*Clcn7*)の性質やその構造と活性化の関係について報告してきた。この結果、常染色体優性骨大理石病 Type II (ADO II)に認められる *Clcn7*の点変異はCl⁻分泌能が低下することが明らかになり、このことがこの病態の主原因となることが示唆された。最近、*Clcn7*を調節する候補分子として *Ostm1* (osteopetrosis associated transmembrane protein 1) の関与が報告された(Nature, 2006)。そこで、この突然変異マウス(*gl/gl mice*)を用いて *Clcn7* の機能変化について検討を行った結果、Cl⁻分泌及び骨吸収能に有意な抑制は認められなかった。従って、*Ostm1* 以外に *Clcn7*の活性化を調節する分子が存在する可能性が考えられた。そこで、破骨細胞に発現する Cl⁻分泌輸送体 *Clcn7* 分子に相互作用し、機能的調節を行う新規分子の検索・同定およびその調節機序を明らかにし、最終的に骨粗鬆症や歯周疾患などの骨吸収異常病変における原因解明や機能的な薬剤開発の一助となることを本研究の目的とする。

本研究計画は、

- 1) 酸分泌輸送体である *Clcn7* の N や C 末端に会合する分子をイーストツーハイブリット法で探索する。この標的分子の破骨細胞における局在と酸輸送体との会合を免疫沈降法や免疫染色法により検討する。
- 2) この調節分子の *in vitro* での過剰発現系や siRNA を用いた silencing による酸分泌機能変化とこれらのシグナル伝達に関して検討する。
- 3) 現在所有・作出しているミュータント及び遺伝子改変マウスを用いこれら酸輸送体における調節分子の下流シグナルを含めた解析を行なう。

以上を行う予定である。

公募研究 C18

研究者名 岡本 富士雄

研究課題 酸性環境下で活性化される破骨細胞の陰イオンチャネルの同定と機能の
解明

研究計画

破骨細胞は、酸(HCl)を分泌して強い酸性環境を形成して骨を溶解する。従って、破骨細胞は自ら酸性環境に暴露されることになる。最近、我々は、マウス破骨細胞を酸性環境下におくと、細胞膜を介した陰イオン輸送が活性化されることを見出した。しかし、この輸送体の分子実体および機能的意義は全く解っていない。そこで、本研究では、酸性環境下で活性化される陰イオン輸送の分子実体とその機能的意義を明らかにする。

1) マウス骨髄細胞またはマクロファージ株化細胞 (RAW264.7) から誘導した破骨細胞に Whole-cell patch clamp 法を適用し、細胞膜を介して流れる陰イオン電流を記録する。酸刺激によって活性化される陰イオン電流 (酸刺激誘発電流) の pH 依存性、活性化キネティクス、陰イオン透過性および種々の陰イオン輸送阻害剤の作用を調べ輸送体の性質を明らかにする。2) 破骨細胞に発現している陰イオン輸送体の分子種を PCR 法および Western blot 法にて検索する。3) 候補となった分子を RNAi 法によりサイレンシングする。酸刺激誘発電流に対するサイレンシングの影響を調べ、陰イオン輸送体分子を同定する。4) 同定した陰イオン輸送体を免疫染色により可視化し、発現局在を確認する。5) 陰イオン輸送体のサイレンシングが骨吸収活性及ぼす影響を調べる。

以上の結果を基に、酸性環境下にて活性化される陰イオン輸送体の分子種とイオン輸送動態を明らかにし、その機能的意義を考察する。