

「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」  
第二回研究発表会

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

## 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<sup>INK4a</sup> の発現が亢進したが、口腔扁平上皮癌細胞では P16<sup>INK4a</sup> には変化がなかった。P16<sup>INK4a</sup> 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<sup>INK4a</sup> 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<sup>INK4a</sup> 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<sup>INK4a</sup> 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 *Sacchaomyces 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 O<sup>6</sup>-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  $\alpha$  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 G<sub>1</sub> 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 Ca<sup>2+</sup>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- $\alpha$ , TGF- $\beta$  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- $\gamma$ 、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  $\gamma$ 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- $\gamma$ 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 $\gamma$ t)の発現を抑制したか、rIL-35はT-bet, ROR $\gamma$ 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- $\gamma$ を発現させ、Th1を介する炎症抑制機構に参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、発生の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 :  $\text{mol}/\text{mol}$  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。

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。