

■モリタ優秀発表賞審査（ポスター）（MP）

日時：9月5日（金）12:50～18:30

会場：ポスター会場（会議場1階 イベントホール）

モリタ優秀発表賞審査「解剖・組織・発生学」（MP1-01～07）

MP1-01 「Na⁺/H⁺ 交換輸送体 Slc9a5 の欠失がエナメル質形成に及ぼす影響の解析」高野 隼人¹、大熊 理紗子²、山本 竜司²、片岡 伶惟³、小林 冴子¹、山越 康雄²、朝田 芳信¹(¹ 鶴大 歯 小児歯、² 鶴大 歯 生化学、³ 鶴大 歯 歯周病)

Na⁺/H⁺交換輸送体であるSolute carrier family 9a5 (Slc9a5) は、エナメル芽細胞にも発現し、エナメル質形成において重要な役割を果たしていると考えられている。

【目的】Slc9a5遺伝子ノックアウトマウスを作製し、エナメル質形成過程におけるSlc9a5の役割を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】野生型 (Slc9a5^{+/+})、ヘテロ接合体 (Slc9a5^{+/-})、ホモ接合体 (Slc9a5^{-/-}) の生後5日、11日、70日の下顎骨を対象とし、免疫染色による組織学的解析、走査型電子顕微鏡 (SEM)、及びマイクロCT (μCT) による形態学的解析を行なった。

【結果】Slc9a5抗体を用いた免疫染色では、Slc9a5^{+/+} マウスの成熟期エナメル芽細胞および象牙芽細胞にお

いて陽性反応が認められた。SEM観察では、Slc9a5^{-/-} マウスの臼歯側面エナメル質に亀裂を認めた。また、μCT観察では、Slc9a5^{+/+} は臼歯咬頭部を中心に石灰化像が滑らかで連続しているのに対し、Slc9a5^{-/-} ではエナメル質形成不全が顕著で、連続性の断裂及び臼歯部エナメル質体積の減少が確認された。切歯においても、Slc9a5^{-/-} マウスエナメル質厚の減少傾向及び表層の高密度領域が著しく減弱しており、エナメル質形成が早期に進行している可能性が観察された。

【考察】Slc9a5遺伝子を欠損したマウスでは、臼歯及び切歯においてエナメル質の形成不全を生じ、Slc9a5 がエナメル質の形成制御に関与することが示唆された。

MP1-02 「骨発生初期における間葉系凝集周囲 Hes1 陽性未分化間葉系細胞の骨格への貢献」

中村 彰吾¹、松下 祐樹¹(¹ 長大 院医歯薬 硬組織発生再生)

骨発生初期では未分化間葉系細胞が凝集し、その後、軟骨原基と周囲の軟骨膜を形成し、その軟骨原基の細胞や軟骨膜細胞が肥大軟骨細胞・骨髄間質細胞・骨芽細胞などの骨格系細胞へと分化する。この一連の過程では、初期の凝集内部の未分化間葉系細胞にSOX9が発現し、ほぼ全ての骨格系細胞の起源となることが知られている。しかし、凝集部を取り囲んでいる未分化間葉系細胞が骨の形成にどのように関与しているかは未だ解明されていない。

今回、われわれは間葉系凝集を取り囲むように、Hes1が発現していることを見出し、Hes1陽性細胞およびその系譜細胞をtdTomatoで標識するHes1-creER; R26RtdTomatoノックインマウスを使用して、細胞系譜

追跡を行った。胎生10.5日、12.5日、14.5日でタモキシフェンを投与し、Hes1陽性細胞の細胞系譜を追跡したところ、胎生10.5日ではHes1陽性細胞は間葉系凝集を取り囲むように存在しており、生後ではHes1陽性系譜細胞は骨髄全体に分布し、骨幹端と骨幹骨髄腔の両方で骨芽細胞や網状間質細胞へと分化していた。一方、胎生12.5日のHes1陽性細胞は軟骨膜を標識し、生後では骨幹部の骨格細胞にのみに寄与した。一方胎生14.5日のHes1陽性細胞の骨格への貢献はわずかだった。

これらのことから、骨発生初期では間葉系凝集を取り囲むようにHes1を発現する未分化間葉系細胞存在しており、骨の発生・成長における骨格前駆細胞の新たな供給源であることが示唆された。

MP1-03 「機械的ストレスは軽症型低ホスファターゼ症モデルマウスにおける局所的な骨の吸収を増強する」

石束 叡¹、高橋 有希²、松永 智¹、阿部 伸一¹、笠原 正貴²
(¹ 東歯大 解剖、² 東歯大 薬理)

【目的】低ホスファターゼ症（HPP）は、組織非特異的アルカリホスファターゼ（TNALP）遺伝子の変異により、硬組織の石灰化不全や乳歯の早期脱落を特徴とする先天性疾患である。軽症型HPP（小児型、成人型、歯限局型）は症状が不明瞭で診断が難しく、歯科矯正力を加えた際の顎骨の変化も明らかでない。そこで本研究は、軽症型HPPマウス（Akp2+/-マウス）に歯科矯正力を加えた際の顎骨の変化を評価し、HPP患者に対する歯科矯正力の影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】50日齢の雄性Akp2+/-マウスに10 gfのニッケルチタン製クローズドコイルスプリングを装着し、正常マウス（Akp2+/+マウス）と比較した。14日間の第一後臼歯（M1）の近心移動後、上顎骨を採取し、

micro-CT撮影、骨質の計測を実施した。組織学的解析にはH-E染色、TRAP染色、免疫組織化学染色を行なった。

【結果】Akp2+/-マウスでは、歯の移動距離に差は認めなかったが、圧迫側の歯槽骨において有意に骨吸収が増加し、海綿骨の骨質が低下していた。さらに、破骨細胞が有意に増加していることが確認された。

【考察】臨床において軽症型HPP患者に矯正治療を行っても、表面上は歯の移動距離や骨密度に異常は見られない。しかし本研究結果から、圧迫側では破骨細胞の増加による骨吸収が顕著に進行しており、歯の喪失などの予期せぬ事象が生じる可能性が示唆された。この結果は、歯科矯正治療前に軽症型HPPを鑑別診断することの重要性を裏付けていると考えられる。

MP1-04 「SCN1A regulates the cell cycle of mesenchymal stem cells」

Mhd Fouad Zakaria¹、Hiroki Kato¹、Mohammed Majd Sharifa¹、Liting Yu¹、
Lisha Dai¹、Arwa Mohamed Aboelmaged¹、Ying Liu¹、Soichiro Sonoda¹
Yukari Kyumoto-Nakamura¹、Takayoshi Yamaza¹
(¹ Kyushu Univ Fac Dent Sci, Sect Mol Cell Biol Oral Anat)

[Background] Sodium voltage-gated channel alpha subunit type 1 (SCN1A) is expressed primarily in excitable cells such as neurons. Meanwhile, SCN1A is also expressed in mesenchymal stem cells (MSCs), suggesting its non-canonical functions. In this study, we aim to analyze the cell cycle regulation of SCN1A in MSCs.

[Methods] Human MSCs were treated with siRNA to functionally knock down SCN1A (siSCN1A). The cell cycle was analyzed using flow cytometry. The expression of cell cycle regulators was analyzed using western blotting and RT-qPCR. The protein degradation was also examined using

cycloheximide-chase assay.

[Results] MSCs expressed SCN1A gene and protein. siSCN1A delayed the cell cycle in the S phase associated with reduced AKT, CDK2 and CDK6. Moreover, siSCN1A induced the protein degradation of CDK2.

[Conclusion] In this study, we have unveiled a novel function of SCN1A in regulating the cell cycle in MSCs via AKT, CDK2 and CDK6. This finding provides new insight into the non-canonical function of SCN1A and suggests the potential for further research into its role in stem cell biology.

MP1-05 「Enhancement of osseointegration after placement of immobilized recombinant osteopontin-coated implants in mouse maxillae.」

Mauricio Andre Zapata-Sifuentes¹、Angela Quispe-Salcedo¹、大島 勇人¹

(¹Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, Div Anat Cell Biol Hard Tissue)

Purpose: This study analyzed the effects of immobilized recombinant osteopontin (irOPN)-coated implants on osseointegration in mouse maxillae.

Methods: After extraction of upper right first molars from 4-week-old ICR mice under deep anesthesia, implant cavities were drilled, and titanium implants coated with irOPN expressed in mammalian cells (irOPN group) or untreated (control) were immediately placed. Samples were collected at 3-, 5-, 7-, 14-, and 28-days after implantation, decalcified, and processed for paraffin sections. Osseointegration dynamics were evaluated by immunohistochemistry for OPN,

Ki67, Cathepsin-K, and Osteonectin.

Results: By day 14, the irOPN group showed a positive osseointegration trend with a significantly higher osteopontin-positive perimeter. Early-stage osteoclastic activity and cell proliferation tended to be higher in the irOPN group.

Conclusion: These results suggest that protein immobilization for irOPN on titanium implant surfaces could positively affect osseointegration by increasing cell proliferation and OPN deposition at the bone-implant interface 14 days after implantation. This study is collaborated with Dr. Tomohiko Yamazaki (NIMS).

MP1-06 「テトラサイクリン歯におけるコラーゲンの分子構造解析：顕微ラマン分光法と赤外二色性イメージングによる評価」

村尾 美羽¹、木村-須田 廣美¹

(¹千歳科技大 院理工)

【背景】テトラサイクリン系抗生物質の歯の形成期における服用は、歯の変色や形成異常を引き起こす。我々はこれまで、変色部においてアパタイトの結晶性が低下していることを報告してきたが、これには同部位のコラーゲンの構造的変化が関与している可能性がある。本研究では、テトラサイクリン歯における歯質異常のうち、コラーゲンに着目し、その分子構造レベルでの変化を明らかにすることを目的とした。

【方法】14歳で歯治療のためにテトラサイクリン系抗生物質（ミノサイクリン塩酸塩）を服用した患者（22歳女性）および服用歴のない患者（26歳女性）から抜去した上顎第3大臼歯は、頬-口蓋側方向に切断した。それぞれEDTAによる脱灰処理を行い、顕微ラマン分光法と赤外二色性イメージングにより象牙質を評価し

た。

【結果・考察】赤外二色性イメージから、正常歯とテトラサイクリン歯のコラーゲン線維は、いずれも象牙細管に沿って配向していることが確認された。一方、テトラサイクリン歯変色部のラマンスペクトルには、終末糖化産物（AGEs）と思われるバンドが観察され、テトラサイクリンの沈着がコラーゲン分子の構造にも影響を及ぼす可能性が示された。

【結論】テトラサイクリンの象牙質への沈着は、変色部のアパタイトの結晶性低下に加え、コラーゲンの分子構造の変化および老化を引き起こす可能性が示唆された。

会員外共同研究者：中村郁哉、横関健治、村田勝、東藤正浩、赤澤敏之

MP1-07 「歯髄傷害後における α -平滑筋アクチン陽性細胞の局在と分化能の検討」

野口 裕季子^{1,2}、建部 廣明¹、岸本 有里¹、溝口 利英³、細矢 明宏¹、
 (¹北医療大 歯 組織、²北医療大 歯 矯正、³東歯大 口腔科学研究セ)

【目的】 α -平滑筋アクチン (SMA) は未分化間葉系細胞に発現し、様々な臓器で創傷後の治癒過程に見いだされる。本研究では細胞系譜解析的手法を用い、歯髄における α -SMA陽性細胞の局在ならびに分化能を検討した。

【方法】実験には4週齢 α -SMA-Cre^{ERT2}/ROSA26-loxP-stop-loxP-tdTomato (α -SMA/Tomato) マウスを用いた。(1) タモキシフェン投与後0、3、14日に、上顎臼歯歯髄における α -SMA/Tomato陽性細胞の局在を観察した。(2) タモキシフェン投与後に上顎臼歯を抜歯し、ただちに野生型マウス皮下へ移植した。0、3、14日後に α -SMA/Tomato、Runx2、Osterixの局在を検討した。

【結果および考察】(1) 4週齢 α -SMA/Tomatoマウスの

歯髄において、血管周囲に限局して α -SMA/Tomato陽性細胞が認められた。この α -SMA/Tomato陽性細胞の数は3、14日後の歯髄においてほとんど変化しなかった。(2) 皮下移植歯の歯髄では、移植3日後に多数の α -SMA/Tomato陽性細胞が認められた。この細胞の一部はRunx2とOsterixの陽性反応を示した。14日後、既存の象牙質に接する修復象牙質と、歯髄中央部に骨様組織が形成された。これら2種類の硬組織表面に局在する細胞は α -SMA/Tomato陽性であり、Runx2およびOsterixと共局在を示した。以上より、 α -SMA陽性歯髄細胞は非刺激時ではほとんど増殖しないが、歯髄傷害後に増殖し、象牙芽細胞と骨芽細胞へ分化することが明らかとなった。

日時：9月5日（金）12:50～18:30

会場：ポスター会場（会議場1階 イベントホール）

モリタ優秀発表賞審査「生理学」（MP1-08～23）

MP1-08 「母親の結紮誘導歯周炎が仔の脳に及ぼす影響」

今井 千尋¹、大杉 勇人^{2・3・4}、Peiya Lin^{2・3}、豊嶋 啓汰⁵、芝 多佳彦¹、
片桐 さやか^{2・3}(¹ 科学大・院医歯 歯周病、² 科学大・院医歯 口腔生命、³ 科学大 口腔科学センター
口腔全身健康部門、⁴ ハーバード大学医学部ジョスリン糖尿病センター、⁵ 科学大・
院医歯 総合診療歯科)

母親の歯周病が子供の脳機能に影響を与える可能性が示唆されている。本研究では、母体の口腔内細菌叢の破綻が仔マウスの脳機能に及ぼす影響とその分子・細胞基盤を多角的に検討した。

12週齢のC57BL/6J雌マウスの上顎第二臼歯に絹糸を4週間結紮して歯周炎を誘導後、健康な雄マウスと交配した。出生した雄の仔マウス（8週齢）に行動解析、前頭前野と小脳でのグリア細胞免疫染色、8週齢および胎児期のRNA-seq解析、小脳のカルシウムイメージングを行い、母親の結紮系および母仔の便から16S rRNA遺伝子に基づいた細菌叢解析を実施した。

その結果、仔マウスはオープンフィールド試験で活動量の減少と、社会性の低下を示した。免疫染色では、

前頭前野と小脳においてアストロサイトが増加していた。RNA-seqでは8週齢小脳に主成分分析の差異と脳機能関連遺伝子の発現変動が認められたが、胎児小脳では差異は認められなかった。カルシウムイメージングではプルキンエ細胞の神経活動頻度低下と活動パターンの乱れが示唆された。母親の口腔内細菌叢は多様性が低下し*Klebsiella* 属が増加、腸内細菌叢には変化がなかった。一方、仔マウスでは腸内細菌叢の多様性が低下し*Staphylococcus* 属が増加していた。

以上より、母親の歯周炎は、細菌叢の変化を介して仔の脳機能、遺伝子発現、アストロサイトの増殖に影響を及ぼす可能性が示唆された。

MP1-09 「リアノジン受容体は象牙芽細胞のステロイド誘発性細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度増加に関与しない」窪山 裕也¹、木村 麻記²、黄地 健仁²、倉島 竜哉²、新谷 誠康¹、澁川 義幸²
(¹ 東歯大 小児歯、² 東歯大 生理)

ステロイドの長期投与で冷・温水による激しい歯痛や歯髓腔形状変化が報告されており、その機序や象牙芽細胞への作用は不明である。本研究では、ヒト培養象牙芽細胞（HOB細胞）のグルココルチコイド受容体（GR）発現、GRアゴニスト投与による細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）動態と石灰化能への影響を検討した。HOB細胞は抗GR抗体に陽性を示した。細胞外 Ca^{2+} 存在下で、GRアゴニストのデキサメタゾン（DEX）を投与すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はDEX濃度依存的に0.001-5 nMの範囲で増加した。一方、細胞外 Ca^{2+} 非存在下では、その増加が抑制され、リアノジン受容体阻害薬投与時と有意差はな

かった。GR阻害薬はDEX誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を抑制した。HOB細胞への機械刺激で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は増加したが、DEXは影響しなかった。石灰化誘導培地にDEXを添加すると、非添加群と比べ、alizarin red染色で100 nM-250 μM 、von Kossa染色で100-500 nM、50-250 μM の範囲のDEX濃度で石灰化が抑制された。したがって、象牙芽細胞にGRが機能的に発現し、DEXは細胞外からの Ca^{2+} 流入とリアノジン受容体を介さない Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を誘発すること、象牙芽細胞の機械感受性に影響しないことが示唆された。加えて、GRの活性化は石灰化を抑制することが示唆された。

MP1-10 「ステロイド由来歯痛の病態」

関矢 日向子¹、黄地 健仁²、倉島 竜哉²、木村 麻記²、山田 雅司¹、澁川 義幸²
(¹ 東歯大 歯内、² 東歯大 生理)

ステロイド服用患者に象牙質知覚過敏様歯痛（以下ステロイド由来歯痛）が報告されている。この歯痛は、冷水または温水により引き起こされる持続性の複数歯にわたる疼痛を特徴とする。本研究では、デキサメタゾン（DEX）投与によるステロイド由来歯痛発症モデルマウスを作製し、その疼痛行動評価および組織学的評価からステロイド由来歯痛の病態を明らかにすることを目的とした。

生後8～20週齢のC57BL/6マウスを使用した（承認番号：250303）。実験（DEX）群は100 μg/mLのDEXを、対照（without; w/o DEX）群は溶媒を21日間連続で0.2 mLずつ腹腔内投与し、下顎前歯への冷水適用後に疼痛行動評価を行った。実験条件はDEX群、w/o DEX群ともに象牙質露出の有無、知覚過敏抑制材として歯科用象

牙質接着剤を用いたボンディング処理の有無により8グループに分けた。評価には疼痛行動評価スケールを使用し、侵害受容スコアを算出した。投薬開始日を1日目とし、行動観察は0日目、7日目、14日目、21日目に行い、行動評価終了後に屠殺し下顎骨を採取、4%パラホルムアルデヒドで組織固定を行った。脱灰後に作製した凍結切片を用いてH-E染色を行い、炎症性細胞浸潤の評価を行った。

象牙質露出の有無に関わらず、21日目の侵害受容スコアはDEX群がw/o DEX群と比較して有意に高いスコアを示した。また、w/o DEX群と比較したDEX群のH-E染色像は毛細血管の拡張および増生を認め、DEX投与は歯髓充血を誘発した。

MP1-11 「象牙芽細胞への直接機械刺激はPiezo1チャネルの活性化に続くアラキドン酸カスケードの活性化を介してTRPV1およびTRPA1チャネルを活性化する」

倉島 竜哉¹、黄地 健仁¹、木村 麻記¹、澁川 義幸¹
(¹ 東歯大 生理)

象牙芽細胞への直接機械刺激はtransient receptor potential (TRP) チャネルサブファミリー (TRPV1、TRPV2、TRPV4、TRPA1) とPiezo1チャネル (Piezo1) の活性化を介した細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 増加を誘発するが、この増加はPiezo1の阻害によりほぼ消失する。この結果から我々は、Piezo1が機械感受性応答シグナル過程の最上流に存在し、その下流シグナルでTRPチャネルを制御していると仮説した。ラット切歯から急性単離した象牙芽細胞を用いて、蛍光免疫染色による細胞内タンパク質発現解析と細胞内Ca²⁺蛍光指示薬を用いた[Ca²⁺]_i測定を実施した。象牙芽細胞においてPiezo1とTRPV1およびTRPA1は共局在を示した。象牙芽細胞への直接機械刺激は、Piezo1・TRPV1・TRPA1

活性化による一過性[Ca²⁺]_i増加とTRPV1活性化による持続性[Ca²⁺]_i増加を誘発した。Piezo1活性薬の投与は、Piezo1による初期[Ca²⁺]_i増加に続くTRPV1・TRPA1による第二相[Ca²⁺]_i増加、TRPV1による持続性[Ca²⁺]_i増加を示した。細胞質型ホスホリパーゼA2 (cPLA2)・シクロオキシゲナーゼ (COX)・アデニル酸シクラーゼ (AC) の阻害は、直接機械刺激による[Ca²⁺]_i増加を完全に抑制した。COX活性薬による[Ca²⁺]_i増加はTRPV1・TRPA1阻害薬で抑制された。以上の結果は、象牙芽細胞への直接機械刺激がPiezo1の活性化に続くcPLA2活性化とCOX代謝産物生成を介して、TRPV1とTRPA1を一過性にTRPA1を持続性に活性化することを示唆する。

MP1-12 「ラット口腔内体性感覚におけるTRPA1の関与」

吉田 希海^{1,2}、中富 千尋²、小野 堅太郎²、川元 龍夫¹
(¹ 九歯大 顎口腔機能矯正、² 九歯大 生理)

TRPA1は化学、温度受容や炎症時の疼痛などに関与する受容体として知られており、口腔内では口内炎や歯科矯正時の疼痛発症に関与する可能性が示唆されている。一方、非侵害性機械刺激の受容での役割は不明

である。本研究ではTRPA1ノックアウトラット (A1K0) を用いて、口腔内触圧覚および口内炎時の疼痛におけるTRPA1の機能を検討した。触圧感覚の評価には粒子性認知試験を用いた。ラットは微結晶セルロース粒子

懸濁液のろ液中に含まれる1.5 μm の微細粒子を認知していることが報告されているため、グルコースを用いた微細粒子への嗜好学習試験により粒子性認知を評価した。口内炎時の疼痛評価には、ラット下顎切歯部唇側歯肉に潰瘍を作成し、2日後に疼痛様行動であるラビング行動を計測した。全ての実験には野生型およびA1K0ラットの雌雄を用いた。粒子性認知試験では、野生型およびA1K0群両群で微細粒子に対する嗜好学習が成立し、両群に有意な差が認められなかった。口内炎

時の疼痛については、A1K0群で潰瘍形成後のラビング時間の有意な増加が認められた。以上の結果は、本実験系での微細粒子認知および口内炎時の疼痛様行動にTRPA1が必須でない可能性を示唆している。過去の報告では、TRPA1阻害薬投与により口内炎時のラビング行動が抑制されており、本研究の結果とは異なる。飼育環境や細菌叢の違い、あるいは遺伝的代償機構の関与により異なる結果が得られた可能性が示唆された。

MP1-13 「三叉神経節 - 三叉神経脊髄路核吻側亜核経路は口腔顔面の神経障害性疼痛発症に関与する」

井手 唯李加^{1,2}、人見 涼露²、林 良憲²、岩田 幸一²、篠田 雅路²
(¹日大 歯 補綴 I、²日大 歯 生理)

三叉神経脊髄路核吻側亜核(Vo)には非侵害受容ニューロンだけでなく侵害受容ニューロンの存在が報告されている。よって、口腔顔面の神経障害性疼痛発症に対する三叉神経節(TG)-Vo経路の関与が考えられるが、詳細は不明である。本研究では、眼窩下神経部分結紮(PNL)モデルラットを用いて口腔顔面の神経障害性疼痛発症に対するTG-Vo経路の役割を検討した。

深麻酔下にて、眼窩下神経を剖出して神経束の1/3を部分結紮したラットをPNL群、剖出のみ施行したラットをsham群とした。PNL処置により、口髭部皮膚の機械逃避閾値(MHWT)が低下し、その低下はVo破壊により回復した。naive群において、光遺伝学的手法を用

いてTG-Voニューロンを光刺激によって脱分極させることにより、MHWTは低下した。PNL群において、口髭部皮膚への機械刺激に対するVoニューロンの発火頻度が増加したが、この増加は口髭部へのTRPA1阻害薬投与で抑制された。PNLによりCGRPおよびTRPA1陽性TG-Voニューロン数が増加した。さらに、PNL群において、TRPA1作動薬投与により脱分極を起こすTG-Voニューロン数が増加した。

以上より、PNL処置後、TG-VoニューロンはCGRPおよびTRPA1発現の増加によって興奮性が増強し、その興奮性増強が顔面皮膚に機械アロディニアを発症させる可能性が示された。

MP1-14 「眼窩下神経損傷後の神経障害性疼痛に対する三叉神経節内 CD8 T 細胞の役割」

小林 桃代¹、人見 涼露²、林 良憲²、坪井 美行²、岩田 幸一²、篠田 雅路²
(¹日大 歯 口内、²日大 歯 生理)

三叉神経障害性疼痛に対する三叉神経節(TG)内T細胞の役割は不明である。本研究では、眼窩下神経損傷(IONI)後の三叉神経障害性疼痛に対するTG内T細胞の役割を検討した。

SD系雄性ラットの眼窩下神経支配領域の口髭部に機械刺激を加え、機械刺激に対する逃避閾値(MHWT)を測定した。IONIによりMHWTが低下した。IONI後7日目、TG内インターフェロンガンマ(IFN- γ)量および活性型衛星細胞(SGC)数は増加した。IFN- γ 受容体は、SGCに発現した。TG内全細胞のうち、IFN- γ 産生細胞の割合はIONI群で増加し、かつ全IFN- γ 産生細胞中の約7割がCD8 T細胞であった。インターロイキン-1 β (IL-1

β)受容体はTGニューロンに発現し、TG内へのIFN- γ 受容体アンタゴニスト持続投与は、IONIによるMHWT低下を抑制した。Naive群において、TG内へのIFN- γ 投与はMHWTを低下させ、その低下はIL-1 β 受容体アンタゴニスト同時投与によって抑制された。Naive群において、IONI後のTGから単離したCD8 T細胞のTG内投与はMHWTを低下させた。IFN- γ 刺激は、培養SGCからのIL-1 β 分泌量を増加させた。以上より、IONI後、TG内CD8 T細胞から放出されるIFN- γ がSGCを活性化し、活性化SGCから放出されたIL-1 β がTGニューロンの興奮性を増大させ、口髭部に機械アロディニアが発症することが示唆された。

MP1-15 「舌癌性疼痛における三叉神経節内マトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) の役割」

高橋 亮輔¹、人見 涼露²、林 良憲²、岩田 幸一²、篠田 雅路²
(¹日大 歯 口外Ⅱ、²日大 歯 生理)

マトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) は、細胞外マトリックスを分解し、癌の血管新生、浸潤、転移に関与することが報告されている。しかし、舌癌性疼痛における三叉神経節内MMP-9の役割は不明である。本研究は舌癌発症後の三叉神経節内MMP-9の役割を明らかにすることを目的とした。

Fisher系ラットの左舌縁にラット由来扁平上皮癌細胞 (SCC-158) を播種し、舌癌モデルラットを作製した。SCC-158播種後、舌に機械刺激を加え、頭部逃避反射閾値を経日的に測定した。播種後6日目、三叉神経節におけるMMP-9の局在を解析し、MMP-9量を定量した。また、SCC-158播種後、三叉神経節にMMP-9阻害薬

を連日投与し、頭部逃避反射閾値を測定した。さらに、無処置ラットの三叉神経節にMMP-9を連日投与し、頭部逃避反射閾値を測定した。

SCC-158接種後4日目以降頭部逃避反射閾値は低下した。MMP-9は三叉神経節活性化サテライトグリア細胞に発現し、その量は増加した。MMP-9阻害薬投与後6日目以降、SCC-158播種による頭部逃避反射閾値の低下は抑制された。またMMP-9投与後6日目以降、頭部逃避反射閾値は低下した。

以上より、舌癌発症後に三叉神経節活性化サテライトグリア細胞に発現するMMP-9が舌癌性疼痛に関与することが示唆された。

MP1-16 「ラット口腔癌性疼痛に対する癌浸潤部 Legumain の役割」

田代 茂太¹、篠田 雅路¹
(¹日大 歯 生理)

Legumain が腫瘍の進展や浸潤に関与していることは知られているが、口腔癌性疼痛に対する役割は不明である。本研究では、ラット舌癌性疼痛に対するLegumain の関与を検討した。

深麻酔下にて、扁平上皮癌細胞株(SCC-158)をFisher344ラット舌縁部皮下に接種した。浅麻酔下にて舌縁に機械刺激を加え、逃避反射閾値(MHWT)を測定した。SCC-158舌接種後3日目よりMHWTが低下した。培養SCC-158および舌腫瘍部の扁平上皮癌細胞にLegumain

の発現を認め、培養SCC-158を接種した舌腫瘍部においてLegumain量が増加した。Legumain 阻害薬またはPAR2 受容体拮抗薬の舌への連日投与はSCC-158舌接種後のMHWT の低下を抑制した。さらに、無処置ラットへの活性化 Legumain 舌投与はMHWTを低下させた。

以上より、舌腫瘍部の舌扁平上皮癌細胞から放出される Legumain がPAR2 受容体を介して舌投射侵害受容ニューロンの興奮性を増大させ、舌癌浸潤部の機械アロディニアが発症することが示唆された。

MP1-17 「線条体マトリックス・ストリオソームの神経活動による舌運動の制御」

石丸 佑太^{1,2}、吉澤 知彦¹、木本 大視^{1,2}、乾 賢¹、船橋 誠¹
(¹北大 院歯 口腔生理、²北大 院歯 小児障害者)

舌の運動制御には大脳基底核の線条体が深く関与している。線条体は解剖学的特徴が異なるマトリックスとストリオソームの2種類の区画で構成される。マトリックスは運動皮質由来の、ストリオソームは辺縁皮質由来の神経線維が入力することから、各区画は舌運動制御において異なる役割を担う可能性がある。そこで、我々は摂食行動時におけるマトリックスとストリオソームの神経活動を比較して、各区画の舌運動制御における役割解明を目的として実験を行った。マト

リックス (n = 5) とストリオソーム (n = 5) の各々の神経細胞特異的に遺伝子組み換え酵素Creが発現する遺伝子改変マウスを使用した。Cre依存的に細胞内カルシウムセンサー GCaMP6fを発現させるため、線条体背内側部(DMS)にAAV5. CAG. Flex. GCaMP6f を微量注入した。各マウスに対して、スパウトを舌でリッキングするとスクロース水を与えるオペラント条件付けを実施した。この時、DMSに埋入した光ファイバーを介して465nm光を照射し、GCaMP6fの蛍光を記録した。そ

の結果、マトリックスだけでリッキング開始0.5~1秒前から神経活動の上昇が観察された。さらにマトリックスの神経活動は、記録脳半球と同側のスパウトをリッキングした場合の方が、対側のスパウトをリッ

ングした場合と比較して有意に増加した。以上の結果から、リッキングによる条件付け時の舌運動制御には、主にマトリックスの神経活動が関与していることが示唆された。

MP1-18 「咽頭炎モデルラットを用いた侵害性気道防御反射機能の解析」

御手洗 直幸^{1,2}、中富 千尋¹、徐 嘉鍵¹、安田 紘佳¹、福崎 まり^{1,3}、折本 愛²、北村 知昭²、小野 堅太郎¹

(¹九歯大 生理、²九歯大 保存、³九歯大 顎口腔機能矯正)

嚥下や咳は気道防御反射であり、咽頭喉頭部での侵害受容体TRPV1やTRPA1の活性化により誘発される。咽頭炎は水刺激反射を低下させることが知られているが、侵害性反射への影響は不明である。

本研究には雄性Wistarラットを用いた。10% 酢酸にて咽頭喉頭部を処理し、咽頭炎を発症させた。刺激溶液として蒸留水、TRPV1作動薬カプサイシン (CPS) およびTRPA1作動薬アリルイソチオシアネート (AITC) を用い、咽頭喉頭部へ流入させた。内視鏡下にて観察し、喉頭蓋挙上によるホワイトアウトを記録した。

複数回のホワイトアウト観察後において、着色した溶液の胃内到達と喉頭内流入を確認した。よって、嚥下と咳に関連した気道防御反射であると考え。健常

群と比較して、咽頭炎群では水刺激反射は低下していたが、CPSとAITCによる反射は維持されていた。CPS誘発反射は連続投与による脱感作の程度が緩やかであり、AITC誘発反射は潜時が延長していた。下咽頭アリテノイドにおいて、神経線維マーカー PGP9.5と共染されたTRPV1もしくはTRPA1陽性線維は粘膜上皮層直下に散在しており、咽頭炎発症によりTRPV1陽性線維に変化はなく、TRPA1陽性線維は少ない傾向にあった。

本結果より、水刺激とは異なり、咽頭炎発症時においてもTRPV1およびTRPA1活性化により気道防御反射が誘発されることが明らかとなった。炎症によるTRPV1感作やTRPA1陽性線維の減少が、咽頭炎後の反射機構に影響していると考えられる。

MP1-19 「脚橋被蓋核刺激による嚥下反射の減弱における巨大細胞網様核の関与」

穂保 由衣¹、佐藤 義英²、大橋 誠¹

(¹日歯大新潟 麻酔、²日歯大新潟 生理)

【目的】我々は脚橋被蓋核(Ptg)の刺激により嚥下反射が減弱し、巨大細胞網様核(Gi)の刺激により嚥下反射が変調することを報告した。形態学的研究から、PtgはGiへ投射しており、Giは嚥下の中枢性パターン発生器の一部である孤束核に投射していることが明らかにされている。本研究ではPtg刺激による嚥下反射の減弱が、Giの電氣的破壊により影響を受けるか検索した。【方法】実験にはウレタン麻酔下ラットを用いた。上喉頭神経(SLN)の連続電気刺激(持続時間0.2ミリ秒、刺激頻度30 Hz、刺激時間10秒)により嚥下反射を誘発し、顎舌骨筋から筋電図を記録した。最初にSLN単

独刺激を行い、次にSLNとPtgの同時電気刺激を10秒行い、再びSLNの単独刺激を行った。嚥下反射が減弱されたことを確認したのち、Giを電氣的に破壊(30 μ A, 5分)した。Giの破壊後、破壊前と同様に、最初にSLN単独刺激、次にSLNとPtgの同時電気刺激、最後にSLN単独刺激を行った。嚥下反射の測定後、脳切片を作成し刺激部位と破壊部位を確認した。【結果】Giの電氣的破壊後、Ptg電気刺激による嚥下反射の減弱はGi破壊前に比べ減少した。

【考察】Ptg刺激による嚥下反射の減弱は、Giが関与していることが示唆された。

MP1-20 「周波数制御式反復微細振動は BMP シグナル経路を介して MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化を促進する」

松下 歩夢^{1,2}、工藤 忠明¹、富並 香菜子¹、安藤 恵子¹、中井 淳一¹
(¹ 東北大 院歯 口腔生理、² 明海大 歯 薬理)

骨粗鬆症治療のための薬物療法は重篤な副作用が認められることがあり、非侵襲性でよりリスクの少ない手法の開発が求められる。物理的刺激は、骨芽細胞及びその前駆細胞の代謝に影響を与える重要因子であり、骨再生において重要な役割を果たすとされるが、微細振動が骨芽細胞の増殖及び分化に果たす役割は不明である。そこで本研究では、骨代謝研究で使用されているマウス前骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1を用い、周波数制御式反復微細振動 (FRMV) が細胞増殖及び分化に与える影響を検討した。その結果、通常の増殖培地中のMC3T3-E1細胞に対し、42.2 HzのFRMVは増殖を有意に促進したが、92.1 HzのFRMVは増殖に影響を与えなかつ

た。また、分化培地中のMC3T3-E1細胞に対し、42.2 HzのFRMVは、増殖には影響しなかったが、アルカリホスファターゼ (ALP) 酵素活性及びALP遺伝子発現を有意に増加させた。さらに、骨形成タンパク質 (BMP) シグナル伝達阻害剤LDN193189をMC3T3-E1細胞に処理したところ、ALP酵素活性及びALP遺伝子発現のFRMV依存的な亢進が有意に抑制された。これらの結果は、本研究で開発されたFRMV法が、前骨芽細胞の細胞増殖やBMPシグナル伝達経路を介した骨芽細胞分化を調節できることを示唆する。以上よりFRMVは効果的な骨再生技術の開発に貢献する可能性がある。

MP1-21 「矯正力負荷による島皮質ニューロン応答のプリズムを用いた慢性イメージング記録」

北野 晃平¹、小林 真之¹
(¹ 日大 歯 薬理)

歯科矯正治療において、矯正力の負荷後に生じる咬合痛は、患者のQOLを低下させる。矯正力負荷中の中枢神経系の変化は広視野イメージング法による急性実験にて検索されてきたが、細胞レベルでの慢性的な変化については未だ不明のままである。そこで本研究では、二光子励起顕微鏡を用いて、矯正力負荷時の歯根膜刺激に対する応答を同一個体で経日的に記録を行った。

【方法】Thy1_GCaMP6sマウスに頭部固定装置を設置し、側頭筋剥離後、中大脳動脈 (MCA) を目印に開窓し、硬膜を除去して島皮質を露出させた。レンズを埋入し、プリズムを接着することで頭頂部方向からのイメージング記録が可能になった。臼歯間にセパレートゴムを

設置した動物の歯根膜を電気刺激し、その応答を覚醒下で二光子励起顕微鏡を用いて定量評価した。MATLABを用いて得られたデータの動き補正をし、細胞毎の蛍光強度の変化量 $\Delta F/F$ を算出した。

【結果】歯間分離前および分離後1-7日目での慢性記録に成功した。刺激開始前をベースラインとして4SDを超える応答を示す歯根膜刺激応答ニューロンを抽出したところ、時間依存的に応答が変化することが明らかとなった。

【考察】矯正力を負荷した直後に疼痛が増強し、その後時間経過と共に減衰していくことから、島皮質における神経細胞の活動動態は、矯正治療により惹起される疼痛の変化を反映していると考えられる。

MP1-22 「分泌顆粒内におけるリソソームプロテアーゼの活性センサーの作製」

藤井 みゆき¹、吉垣 純子²、長坂 新¹、坂東 康彦¹、小野澤 豪^{1,3}、鈴木 海登^{1,3}、天野 修¹
(¹ 明海大 歯 組織、² 日大松戸歯 生理、³ 明海大 歯 口腔顎顔面外科)

【目的】唾液腺腺房細胞は唾液タンパク質を合成し、分泌顆粒に貯蔵する。分泌顆粒の細胞内貯留が長期化すると、分泌顆粒が劣化して組織損傷を引き起こす。組織恒常性維持には、劣化した分泌顆粒を適切に処理しなければならないが、処理機構は不明である。本研究では、劣化した分泌顆粒の処理機構を明らかにするために、分子内FRETタンパク質であるmScarlet

I-protease recognition peptide-mWatermelon (SPW) を用いて、分泌顆粒中のプロテアーゼ活性を測定する方法を開発した。

【方法】SPWが持つプロテアーゼ認識配列をそれぞれ酸性pHと中性pH時にカテプシンBで切断されるように改変した (SPW46, SPW72)。SPW46とSPW72を組み込んだプラスミドを大腸菌に遺伝子導入して発現させ、精製し

た。酸性と中性pHに調整した精製SPWとカテプシンBを0-60分間反応させ、電気泳動後に染色し切断型と非切断型の合計に対する切断型の比率を算出した。また、pHを調整したSPW46またはSPW72をカテプシンBと反応させた際のFRETの変化を蛍光分光光度計で測定した。
【結果と考察】SPWの切断率とFRETの変化率はよく一致

しており、FRETの変化でSPWの切断を計測できることがわかった。SPW46とSPW72ともに酸性下で切断され、時間とともに切断率が増加していた。一方、中性下ではSPW46とSPW72ともに切断されなかった。これらのことより、SPW46は酸性pHでのカテプシンBの活性センサーとして使用できることが示唆された。

MP1-23 「オキシトシン / オキシトシン受容体は中枢唾液分泌を促進する」

堀江 謙吾¹、Lihanfang Liu¹、美藤 純弘¹、吉田 竜介¹

(¹ 岡大 院医歯薬 口腔生理)

オキシトシン (OXT)は主に視床下部で産生されるホルモン・神経伝達物質であり、末梢や中枢の様々な組織・神経核に発現するオキシトシン受容体 (OXTR)を介して身体機能を調節する。近年、前脳OXTR発現神経細胞が他個体に対する社会・向社会行動を制御することが盛んに報告されてきた。一方、OXTRは脳幹での広範な分布も知られているが、脳幹OXTRが制御する生理機能はいまだに不明な点が多い。

本研究では、マウスの脳幹OXTRの発現を探索し、唾液分泌の中枢である上唾液核にOXTR陽性細胞が豊富に存在することを見出した。また、末梢神経トレーシングによって、上唾液核OXTR陽性細胞は顎下腺・舌下腺を支配する副交感・節前神経細胞であることを明らか

とした。急性脳切片を用いた電気生理学的解析の結果、OXT投与によって上唾液核OXTR神経細胞に活動電位が生じた。さらに、覚醒マウスの上唾液核へのOXT投与が唾液分泌を有意に増加させたことから、上唾液核OXT/OXTRは生体において唾液分泌促進作用を示すと考えられる。最後に、中枢トレーシングによって室傍核OXT神経細胞が上唾液核OXTR神経細胞の近傍へと投射を持つことを発見した。

これらの結果は、上唾液核のOXT/OXTRシステムが興奮性神経伝達を介して副交感・節前神経を活性化し唾液分泌を促進することを示しており、中枢唾液分泌の新規分子メカニズムであることを示唆している。

日時：9月5日（金）12:50～18:30

会場：ポスター会場（会議場1階 イベントホール）

モリタ優秀発表賞審査「生化学」（MP1-24～43）

MP1-24 「高スクロース水の継続摂取による成長期ラットの唾液と顎下腺に及ぼす影響」

吉田 織恵¹、森田 貴雄²、山口 晴香²、下村-黒木 淳子¹

(¹ 日歯大新潟 小児歯、² 日歯大新潟 生化学)

【目的】器官の成長発育は食事により影響を受けるため、幼少期の栄養摂取は唾液腺の成長発育に影響を与え、齲蝕感受性への関連が示唆される。本研究は幼少期からのスクロースの過剰摂取は唾液腺の成長発育や唾液成分にどのような変化を与えるか検討した。

【材料・方法】ラット(Wistar)の雄をコントロール群(Control:C群, n=10)と実験群(Sucrose:S群, n=10)に分け、C群には蒸留水を、S群には15%スクロース液を継続摂取させ、3～12週齢までの9週間飼育した。餌は同じ通常飼料を選択した。飼育中の体重、血糖値、飲水量、餌摂取量を計測し、摂取カロリーを比較した。3週ごとにピロカルピンの腹腔内投与による全唾液分泌量と唾液中のタンパク質量を測定した。12週齢ラットの顎

下腺を単離し組織重量を測定した。顎下腺組織におけるHE染色及び唾液腺の成長や齲蝕感受性に関与が示唆される遺伝子発現の変化を定量PCRで解析した。

【結果と考察】S群はC群と比較し摂取カロリーが有意に増加した。体重及び血糖値、全唾液分泌量、唾液タンパク質量、組織重量は両群間に差は見られなかった。HE染色においても両群間で明確な違いは見られなかった。定量PCRの結果、S群でEGFおよびCa6の低下、MUC5Bの上昇を認めた。

【結論】高スクロース水の継続摂取は遺伝子レベルで顎下腺の成長因子と齲蝕感受性に影響を与え、齲蝕高リスクへの機能的及び器質的变化が考えられた。

MP1-25 「シェーグレン症候群モデルマウスにおけるピロカルピン反復投与が与える唾液分泌への影響」

板垣 壮侑¹、山口 晴香¹、森田 貴雄¹

(¹ 日歯大新潟 生化)

【目的】シェーグレン症候群は外分泌腺機能が障害される自己免疫疾患であり、ムスカリン受容体アゴニストであるピロカルピン(Pilo)はこの疾患に対する唾液分泌促進薬として、使用される。ピロカルピン反復投与による唾液分泌亢進を認めるが詳細については不明である。本研究ではシェーグレン症候群モデルマウスにおけるPilo反復投与による影響について検討した。

【方法】16週齢のシェーグレン症候群モデル(NOD)マウスと野生型(ICR)マウスに麻酔下でPiloを腹腔内投与し、1週間後、同じマウスに同量のPiloを投与し、唾液分泌量変化を解析した。採取した唾液中のタンパク質濃度をQubit、アミラーゼ活性を α アミラーゼ測定キットを用いて解析した。顎下腺膜分画のAQP5発現を

ウェスタンブロットで解析した。

【結果・考察】ICRはPilo反復投与により、唾液分泌量、タンパク質濃度は上昇傾向を示し、アミラーゼ活性は有意に上昇した。NODにおいて、唾液分泌量、タンパク質濃度、アミラーゼ活性においてICRのような上昇傾向は見られなかった。16週齢同士のICR、NODとの比較において、唾液分泌量はICRの方が有意に高く、タンパク質濃度、アミラーゼ活性は低い傾向にあった。Pilo反復投与によりICR、NOD共にAQPとBeta-actinの増加傾向を示した。Pilo反復投与による唾液分泌量におけるICRとNODの違いから、NODにおいて、Pilo投与による唾液分泌増加のメカニズムに障害がある可能性が考えられる。

MP1-26 「骨抽出物中に含まれる非コラーゲン性タンパク質と生理活性物質」郡 啓介^{1,2}、山本 竜司²、大熊 理紗子²、唐木田 丈夫²、白井 麻衣¹、山越 康雄²
(¹ 鶴大 歯 口腔リハビリ、² 鶴大 歯 生化学)

ラット大腿骨を脱灰した脱灰骨シートは骨再生促進効果を示し、その効果はシートに含まれる骨タンパク質に起因すると考えられている。

【目的】本研究では、脱灰骨中の骨造成に關与する生理活性物質と相互作用する非コラーゲン性タンパク質(NCP)の特定を目的とした。

【材料及び方法】6週齡雄性SDラット大腿骨から軟組織を除去後、粉碎機で骨粉を作製し、塩酸グアニジン(G1画分)、塩酸・ギ酸(H画分)、塩酸グアニジン(G2画分)を用いて連続抽出した。各画分のタンパク質はSDS-PAGE後にクマシーブリリアントブルー染色とStains-All染色により検出した。さらに、ヒト歯根膜

細胞(hPDL)を用いてトランスフォーミング成長因子 β (TGF- β)様活性、マウス骨格筋由来線維芽細胞(C2C12)を用いて骨形成タンパク(BMP)様活性を評価した。

【結果】各画分に特有のタンパク質を認め、H画分とG2画分では50~64kDa付近にStains-All陽性の酸性NCPが検出された。hPDL細胞では全画分にTGF- β 様活性、C2C12細胞ではH画分およびG2画分にBMP様活性が確認された。

【考察】H画分とG2画分に存在する酸性NCPは、TGF- β およびBMP様活性と相互作用し、骨造成に寄与する可能性が示唆された。

MP1-27 「血小板活性化因子(PAF)分解酵素 PLA2G7 遺伝子 rs1051931 非同義多型(Val379Ala)は、術後異常感覚・術後疼痛に關連する」林 真由子^{1,2}、小鹿 恭太郎¹、松浦 信幸¹(¹ 東歯大 麻酔、² 東京都医学総合研究所 臨床医科学研究分野)

【目的】血小板活性化因子(PAF)は炎症を引き起こす脂質メディエーターであり、PAFがPAF受容体を活性化させPAF産生を増強させることや、動物実験ではPAFと疼痛との關連が報告されている。PAF-Aセチルヒドロラーゼ(AH)(PLA2G7)はPAF加水分解酵素である。今回、PAF-AH活性の低下もしくはPAF-AH血中濃度の低下を引き起こすPLA2G7遺伝子rs1051931非同義多型(Val379Ala)と術後痛關連表現型との關連を検討した。(2024年10月20日に本学学会で発表済み)

【方法】当院で下顎枝矢状分割術を行った303名(TD)と他院で腹腔鏡下婦人科手術を行った332名(JUH)を対象とした。TDサンプルでは異常感覚の評価を行い、JUHSAMPLEでは術後の疼痛をNumeric Rating Scale

(NRS)で評価した。血液由来DNAを用い、上記多型の遺伝子型を決定し、解析を行った。(倫理審査委員会承認番号812-2、2015053、23-32、21-26(1))

【結果】上記多型は、TDサンプルで異常感覚($p = 0.0491$)、JUHSAMPLEで平均NRS($p = 0.0243$)と有意な關連を示した。上記多型のCC遺伝子型ではTT+TC遺伝子型と比べ異常感覚が出やすく、術後痛における平均NRSが大きかった。

【考察】上記多型CC遺伝子型では、血中PAF-AH活性低下に伴い、血中PAF総量が増加することで、PAFが再びPAFを産生するループとなり、PAF受容体を介した炎症応答がより促進され、異常感覚の発生や術後痛の増悪を引き起こす可能性がある。

MP1-28 「SLITRK1 null 再生筋では小型の筋線維が形成される」井上 萌李¹、白川 智彦¹、William Addison²、松原 琢磨²、川元 龍夫¹、古株 彰一郎²(¹ 九歯大 顎口腔機能矯正、² 九歯大 分子情報生化学)

【目的】神経系と骨格系では、発生や恒常性維持において代謝的かつ機能的なクロストークの存在が示唆されている。われわれは最近、細胞膜貫通型タンパク質SLITRK1が骨芽細胞分化を調節し、その欠損が皮質骨の菲薄化をもたらすことを報告した。そこで本研

究では、骨芽細胞と近縁である筋芽細胞に発現するSLITRK1の筋再生における機能を解析した。

【方法】8週齡雄のSLITRK1 nullマウスを用いた。前脛骨筋にカルディオトキシンを注入して損傷を引き起こし、筋再生を誘導した。磁気活性化細胞選別法により

骨格筋組織幹細胞であるサテライト細胞を単離しRNA-seq解析を実施した。

【結果】SLITRK1 nullマウスの再生筋では、筋線維の断面積が有意に減少し、単位面積あたりの筋線維数は有意に増加していた。さらにSLITRK1 null由来のサテライト細胞では、分化初期から小型の筋管を多数形成した。RNA-seq解析では、SLITRK1 nullマウスにおい

て低分子量Gタンパク質関連因子の発現変動が確認され、骨格筋分化に関与することが知られるRhoAタンパク質の増加を認めた。

【結論】SLITRK1欠損によりRhoAの発現が亢進し、サテライト細胞が十分に増殖する前に分化を開始することで、細い再生筋が形成される可能性が示唆された。

MP1-29 「歯髄炎における組織応答分子のトランスクリプトーム解析」

西村 俊輝^{1,2}、埴 太宥²、工藤 朝雄²、興地 隆史¹、添野 雄一²
(¹ 日歯大 生命歯 保存、² 日歯大 生命歯 病理)

【背景と目的】歯髄炎における分子機構は、基本的な炎症・免疫応答を中心に理解されてきたが、血管、神経、象牙芽細胞を含む歯髄環境では、特異的な刺激応答や病態進行も想定される。本研究では、歯髄の構成的な分子プロセスに注目し、歯髄炎の病態進行に関与する分子を明らかにすることを目的とした。

【方法】歯髄炎の公開バルクトランスクリプトームデータ(GSE198359およびGSE77459: 健常歯髄n=10、歯髄炎歯髄n=10)を用いてそれぞれ発現差解析を実施し、共通の差次的発現遺伝子(DEG)を抽出した。得られたDEGに対して非免疫学的なBiological Processに関するGene Ontology (GO) との積集合を評価した。

【結果と考察】発現差解析では、高発現305個、低発現28個のDEGを得た。それぞれのDEGから、高発現群では免疫関連経路、低発現群では神経機能関連経路の関与が示された。非免疫学的(歯髄構成関連)なGOカテゴリでは、vasculature development; 24個、nervous system development; 33個、odontogenesis; 5個、osteoclast differentiation; 6個、stem cell differentiation; 5個のDEGを抽出した。特に*AQP1*、*LIF*、*COL4A1*、*INHBA*、*SOX18*、*TREM2*は複数のカテゴリに共通しており、血管新生、神経応答、細胞分化、組織構築といった非免疫学的プロセスへの横断的な関与を通じて歯髄応答に働く可能性が示唆された。

MP1-30 「歯周炎と関節リウマチ病態間の分子作用機序の探索」

泉 雄太^{1,2}、埴 太宥²、工藤 朝雄²、西村 俊輝^{2,3}、添野 雄一²、沼部 幸博¹
(¹ 日歯大 生命歯 歯周病、² 日歯大 生命歯 病理、³ 日歯大 生命歯 保存)

【背景と目的】歯周炎と関節リウマチ病態の相互連関について、免疫学的な接点が明らかになってきたが、分子動態の観点では、両疾患併存下での分子間相互作用の探索は難しい。本研究では、歯周炎と関節リウマチの病態進行に関与する分子ネットワークの解明を目的とした。

【方法】GEO (Gene Expression Omnibus) より歯周炎(GSE173078; 健常歯肉n=12、歯周炎歯肉n=12)および関節リウマチ(GSE77298; 健常滑膜n=7、病的滑膜n=16)の公開バルクトランスクリプトームデータを用い、それぞれ発現差解析を実施し、歯周炎と関節リウマチ共通の差次的発現遺伝子(DEG)を積集合にて抽出した。得られた共通DEGに対してIngenuity Pathway Analysis

(IPA) によるパスウェイ解析とGene Ontology (GO) を用いたBiological Processの探索を行った。

【結果と考察】発現差解析では、歯周炎歯肉組織で高発現461個、低発現79個のDEG、関節リウマチ滑膜組織では高発現1,520個、低発現2,499個のDEGが得られ、それらの積集合から共通高発現遺伝子117個、共通低発現遺伝子7個を抽出した。IPAでは、自然免疫による食作用、B細胞活性化や抗体産生経路の活性化がみられた。共通高発現遺伝子のGOカテゴリとして、破骨細胞分化や脈管発生、組織応答などの非免疫学的プロセスのほか、神経発生など両疾患で発現プロファイルが異なったカテゴリも見出され、歯周組織固有の病態基盤が示唆された。

MP1-31 「シグナル分子 PRIP の欠損は腸管免疫制御の破綻を引き起こす」

神園 藍¹、松田 美穂¹、自見 英治郎^{1,2}(¹ 九大 院歯 口腔細胞工学、² 九大 院歯 OBT 研究セ)

腸管には腸管関連リンパ組織 (GALT) という独自の粘膜免疫系が発達し、腸内環境の恒常性を維持している。腸管免疫系が自己組織への免疫応答を回避しつつ生体防御機能を発揮するメカニズムの全容解明には至っていない。我々はシグナル分子PRIP (PLC-related but catalytically inactive protein) に着目し、*Prip* 遺伝子欠損 (PRIP-KO) マウスの解析からGALT代表組織であるパイエル板の欠損を見出した。このことからPRIPがパイエル板形成や腸管免疫の制御に関与する可能性が示唆された。細胞種特異的*Prip*欠損マウスの解析から、パイエル板形成不全の主な原因は、リンパ

球系のLTi細胞における*Prip*ファミリーである*Prip2*欠損であることが判明した。そこで、PRIP2-KO (KO) マウスにデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 溶液を投与し腸炎マウスモデルを作製したところ、KO群はWT群に比べ腸炎重症度 (DAIスコア) が有意に高く、死亡例も認められた。また肉眼解剖より、KO群では腸管長の短縮や脾臓の肥大を認めた。組織学的解析では、大腸陰窩構造の破壊やマクロファージ数の有意な増加が観察された。以上より、*Prip*欠損は腸管免疫機構の破綻と防御機能の低下を引き起こすことが示唆された。

MP1-32 「In vivo エレクトロポレーション法及び RNA 干渉法を用いた局所的遺伝子ノックダウンによる口内炎発症機序の解明」

芝 典江¹、宮内 睦美¹、太田 耕司¹(¹ 広大 院医系科学)

【緒言】口内炎は最も頻度の高い口腔粘膜疾患であり、疼痛により著しいQOLの低下をきたす。我々は口内炎発症の開始期過程を再現したモデルハムスター (口内炎モデル) を構築し、漢方薬の約7割に配合される甘草の主成分 (グリチルリチン酸; GL) を予防的に連用することで、口内炎の発症が軽減されることを見出した。本研究では、口内炎モデルにおける網羅的遺伝子発現解析データから口内炎発症に関与する候補遺伝子を抽出し、逆遺伝学的手法により新たな口内炎発症機序を解明することを目的とした。

【材料・方法】1)口内炎モデル頬粘膜のRNA-Seq結果から、GL連用群で発現上昇が抑制される遺伝子 (口内炎発症に関与する候補遺伝子) を抽出した。2)RNA干渉

法による候補遺伝子の局所的ノックダウン (KD) を行うために、エレクトロポレーション (EP) 法による遺伝子導入条件を組織学的に検証し確立した。3) 2で確立した条件を用い siRNAを口内炎モデルの頬粘膜に導入し候補遺伝子をKDした後、口内炎を誘発した。

【結果】1)RNA-SeqのGene Ontologyエンリッチメント解析結果から、8つの候補遺伝子を抽出した。2,3)確立した条件を用いEP法により候補遺伝子のsiRNAを頬粘膜に導入後、口内炎を誘発した結果、炎症性サイトカインの保護タンパク質であるArid5aをKDした場合において口内炎の発症は有意に抑制された。

【結論】Arid5aが口内炎発症の責任遺伝子である可能性を逆遺伝学的にはじめて示した。

MP1-33 「炭酸脱水酵素 12 のエナメル質形成過程における動態」

片岡 伶惟¹、大熊 理紗子²、高野 隼人³、山本 竜司²、唐木田 丈夫²、野々山 駿¹、山越 康雄²、長野 孝俊¹(¹ 鶴大 歯 歯周病、² 鶴大 歯 生化学、³ 鶴大 歯 小児歯)

エナメル質の石灰化は形成期と成熟期の二段階で進行する。成熟期エナメル質では、結晶形成に伴って生じたプロトンが炭酸脱水酵素 (CA) の触媒作用により中和化される。CAにはいくつかのアイソザイムが存在し、エナメル質形成ではこれまでにCA2やCA6の作用が報告されている。

【目的】新たにCA12のエナメル質形成過程における動態を明らかにすることを目的とした。

【方法】マウスエナメル上皮細胞株 (mHAT9d) をTGF-βで刺激し、次世代シーケンシング (NGS) を行い、CAアイソザイムの発現レベルを比較した。この結果を基に、生後5日および11日齢マウスの歯におけるCA12の

局在を免疫染色にて調べた。さらに、生後約5ヶ月のブタ永久切歯エナメル器を用いてCA12遺伝子の発現を定量PCRにて分析した。

【結果と考察】mHAT9d細胞のNGS解析では、TGF- β 刺激によってCA12の発現が増強していた。免疫染色では、CA12は生後11日齢のエナメル芽細胞の遠位細胞膜に陽性を示したが、生後5日齢では確認出来なかった。さ

らにブタ永久切歯エナメル器のCA12遺伝子発現解析では形成期と比較し、移行期および成熟期に高発現していた。

【結論】CA12はエナメル質形成過程においてTGF- β によって遺伝子発現が増強され、成熟期エナメル芽細胞膜に局在しながらプロトンの中和化に関与していることが示唆された。

MP1-34 「ブタエナメル質形成における無機リン酸供給機構について」

兒玉 羽矢¹、大熊 理紗子²、山本 竜司²、濱仲 正二²、山越 康雄²、長野 孝俊¹
(¹鶴大 歯 歯周病、²鶴大 歯 生化学)

【目的】エナメル質形成で結晶の構成要素である無機リン酸(Pi)の供給について解明することを目的とした。

【方法】生後約5ヶ月のブタ切歯歯胚より形成期、移行期、成熟期のエナメル芽細胞を抽出し、ヌクレオチドピロホスファターゼ(Enpp)1, 4, 5、酸性ホスファターゼ(Acp) 4、リン酸トランスポーター(Xpr1)、パネキシン3(Panx3)、およびピロリン酸トランスポーター(ANKH)および組織非特異的アルカリホスファターゼ(Tnap)の遺伝子発現を定量PCRにて解析した。また、ブタ第二大臼歯歯胚より形成期および成熟期のエナメル質を採取し、アデノシン三リン酸(ATP)とピロリン酸(PPi)定量を行うとともに、ACPおよびアルカリホスファターゼ(ALP)の活性を測定した。

【結果】Enpp4, 5、Acp4、Xpr1、Panx3、ANKHおよびTnapは基質形成期で高い発現を示し、Enpp1は成熟期で顕著な発現を示した。ATPは幼若エナメル質にて顕著に検出され、PPiはエナメル質結晶に結合して存在し、その量は成熟期エナメル質において多かった。また、ALP活性は両期において検出されたが、ACP活性は基質中でほとんど検出されなかった。

【考察】ブタエナメル質形成過程における無機リン酸の供給機構としては、(1)Xpr1を介した直接的供給機構、(2)Panx3によるATP-Enpp-Tnapによる生成機構、(3)ANKHによるPPi-Tnapによる生成機構が示唆された。

【結論】エナメル質の結晶成長において様々なPi供給機構が重要な役割を担っている。

MP1-35 「オステオプロテゲリンのヒト遺伝子変異が細胞外分泌および RANKL 結合に与える影響」

鈴木 怜奈¹、福田 尚代²、福田 しんじ²、佐藤 琢麻¹、宮澤 健¹、鈴木 崇弘²
(¹愛院大 歯 矯正、²愛院大 歯 生化)

矯正治療における歯の移動には骨リモデリングが深く関わっており、破骨細胞上のRANKと骨芽細胞上のRANKLの結合が重要である。この結合により、破骨細胞が分化・活性化し、骨吸収が促進される。一方、Osteoprotegerin (OPG) は骨芽細胞から分泌され、RANKLのデコイ受容体として働き、RANKL-RANK結合を阻害することで破骨細胞の分化を阻害し、骨吸収を抑制する。OPGの機能不全は、過剰な骨吸収を引き起こし、代謝性骨疾患を生じる。OPGはTNFRSF11B遺伝子によってコードされており、これまでに若年性骨Paget病など骨リモデリングの異常疾患におけるOPGのTNFRSF11B遺伝子変異が報告されている。しかし、各変異がどの

ようにOPGの機能に影響を与えるのかについては未解明であった。我々は*Gaussia luciferase* (GLase)を融合させたOPGタンパク質を用いて、TNFRSF11B遺伝子変異がOPG分泌へ与える影響を評価した。その結果、6つの変異型OPG全てにおいて野生型と比較して分泌異常を示した。さらに、1つの変異(F117L)を除き、他の5つの変異型OPGは小胞体で滞留することを明らかにした。現在、F117L変異がもたらすOPG機能異常の分子機構を明らかにするために、RANKLとの結合能実験を行っている。

【利益相反】開示すべき利益相反関連事項はない。

MP1-36 「骨吸収誘導性 TGF- β が破骨細胞活性と骨芽細胞分化に及ぼす影響」大熊 理紗子¹、唐木田 丈夫¹、山本 竜司¹、山越 康雄¹
(¹ 鶴大 歯 生化学)

トランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- β) は骨基質中に大量に存在していて、破骨細胞による骨吸収によって活性化され放出される。

【目的】我々は骨吸収によって放出されたTGF- β が骨カップリングに及ぼす影響を調べることを目的とした。

【材料・方法】潜在型TGF- β を結合させたCa-Pコーティングプレートを用いて、RAW264細胞およびマウスより抽出した骨髄細胞を用いて、破骨細胞へと分化させ、骨吸収活性を測定した。またqPCRおよび組織学的解析を行った。さらに、RAW264細胞の培養上清 (CM) を回収し、CMを骨芽細胞 (ST2細胞) または骨細胞 (UMR106細胞) にそれぞれ添加し、ALP活性の測定またはqPCRを行った。

【結果・考察】RAW264細胞、マウス骨髄細胞ともに、TGF- β 存在下では骨吸収活性が有意に上昇していた。また、TGF- β 存在下では骨リモデリングに関与する遺伝子およびタンパク量が有意に増加していた。さらにCMの添加によって、ST2細胞はALP活性が上昇し、UMR106細胞はRankl/Opnの割合が減少していた。以上より、骨吸収によって放出されたTGF- β は、破骨細胞自身および破骨細胞前駆細胞を活性化させ、骨吸収を促進することが示唆された。そして、TGF- β は破骨細胞からのカップリング因子の産生を促進することにより、間接的に骨芽細胞分化誘導を促進することが示唆された。

MP1-37 「生物発光を用いたスクレロスチンの分泌イメージングと疾患関連変異体の評価」

谷 太久哉^{1,2}、福田 尚代²、近藤 久貴³、佐藤 琢麻¹、宮澤 健¹、福田 信治²、鈴木 崇弘²
(¹ 愛院大 歯 矯正、² 愛院大 歯 生化、³ 愛院大 短大)

矯正治療における歯の移動には、骨形成と骨吸収からなる骨リモデリングが重要である。このうち骨形成の制御に関与する因子として、骨細胞が産生するスクレロスチン (sclerostin, SOST) が知られている。sclerostinはSOST遺伝子にコードされる分泌タンパク質であり、WntのアンタゴニストとしてLRP5/6に結合し、Wnt経路の活性化を阻害することで骨形成を抑制する。これまでに骨硬化症などの疾患に関連してSOST遺伝子の塩基変異がいくつか報告されているが、遺伝子変異データベースClinVarに登録されている多くの変異について未だ十分な機能解析が行われておらず、疾患発症に関わる分子機構はほとんど不明である。本

研究において我々は、発光酵素 *Gaussia luciferase* (Glase) を用いてsclerostin の分泌動態を解析した。骨細胞様細胞株MLO-Y4に野生型ヒトsclerostin とGlaseとの融合タンパク質 (SOST-Glase) を発現させ、発光顕微鏡システムにより開口分泌の瞬間を可視化した。また、培養上清および細胞抽出液中の発光活性を指標としSOST-Glaseの分泌を定量し、細胞外への分泌が低下するsclerostin変異体を同定した。本研究は、生物発光を用いてsclerostin の分泌を可視化・定量した初めての報告であり、SOST遺伝子変異による骨代謝疾患の病態解明に新たな知見を提供するものである。

MP1-38 「エネルギー代謝における Id4 の役割」

木下 航志^{1,2}、林 慶和^{1,3,4}、佐伯 彩華¹、高橋 一郎²、平田 雅人⁴、自見 英次郎^{1,5}、安河内 (川久保) 友世¹(¹ 九大 院歯 OBT 研究セ、² 九大 院歯 矯正、³ 福歯大 機能構造、⁴ 福歯大 口腔医学研究セ、⁵ 九大 院歯 口腔細胞工学)

Id proteins (Inhibitor of differentiation/DNA binding proteins)は、bHLH型転写因子ファミリーに属するタンパク質で、主に細胞の分化や増殖の制御に関与する転写抑制因子として知られている。哺乳類で

はId1からId4の4種類が存在するが、Id4の標的分子や生理機能の詳細は不明である。そこで本研究では、肝臓におけるId4の役割について、Id4欠損 (Id4 KO) マウスを用いた解析を行った。

本研究で用いたId4 K0マウスは、野生型(WT)マウスと比較し、低体重で、死因は不明であるが約20日齢で致死となるため、その解析は2週齢で行った。RNA-seq解析において、Id4 K0マウスの肝臓における脂肪酸合成酵素、脂肪酸伸長酵素の顕著な低下が認められ、それらの発現制御に関わる転写因子をコードする遺伝子群の発現が減少していた。また、Id4 K0ではWTマ

ウスと比べ、血糖値、血清遊離脂肪酸濃度が有意に上昇していることが示された。さらに、Id4 K0マウスではWTマウスに比べて、肝臓における脂肪酸合成が低下していることが確認された。以上より、Id4が肝臓における脂肪酸合成に関与していること、また、脂肪酸合成・代謝不全がId4 K0マウスの生存期間短縮に寄与している可能性が示唆された。

MP1-39 「ブラジル産グリーンプロポリス含有 4-META/MMA-TBB レジン系修復材料の試作」

鶴田 はねみ¹、神谷 真子²、シィファ ラハマン¹、新谷 耕平³、池野 久美子⁴、中村 源次郎⁴、川木 晴美⁵、奥山 克史¹、近藤 信夫⁶

(¹朝日大 歯 保存・歯冠修復、²朝日大 経営 化学、³朝日大 歯 理工、⁴秋田屋本店 研究開発部、⁵朝日大 歯 口腔生化、⁶朝日大 歯 化学)

【目的】4-META/MMA-TBBレジンは歯質接着性や生体親和性に優れ、歯科用接着材として広く使用されているが、これに治癒効果の促進を目的としてブラジル産グリーンプロポリス(Brazilian Green Propolis: BGP)の添加を試みた。我々は既に、BGPが抗D3抗体刺激脾細胞の炎症性サイトカイン(IFN- γ)の産生を抑制し、IL-2の産生を介して抑制性サイトカイン産生を促進すること、およびBGP添加4-META/MMA-TBBレジンは機械的強度が損なわれないことを確認している。本研究では抗炎症作用への影響を評価した。

【方法】MMAに0.5～10 wt% BGPを添加した4-META/MMA-TBBレジン(Super Bond、サンメディカル)を用いた。

24週齢以上のC3H/HeN系雄性マウスの脾細胞をRPMI 1640培地に懸濁し、48ウェルプレートにBGP含有レジン硬化体を敷き、抗CD3抗体ビーズと共に脾細胞を播種し37℃、5 %CO₂で48時間培養した。培養上清中のIL-2産生量をELISA法で測定した。

【結果】BGP添加群では、コントロールと比較してIL-2産生量の増加が認められた。

【結論】BGPを混和した4-META/MMA-TBBレジンは、接触培養した抗CD3抗体刺激脾細胞のIL-2産生を促進することで、抑制性サイトカイン産生を促進する可能性が示された。

MP1-40 「ブラジル産グリーンプロポリス(BGP)の主要成分 Artepillin C による抗体刺激マウス脾細胞の炎症性および Th2 サイトカイン産生制御」

シィファ ラハマン¹、鶴田 はねみ¹、神谷 真子²、高橋 萌³、池野 久美子⁴、中村 源次郎⁴、川木 晴美⁵、村松 泰徳³、奥山 克史¹、近藤 信夫⁶

(¹朝日大 歯 保存・歯冠修復、²朝日大 経営 化学、³朝日大 歯 口外、⁴秋田屋本店 研究開発部、⁵朝日大 歯 口腔生化、⁶朝日大 歯 化学)

我々は既に、ブラジル産グリーンプロポリス(BGP)が、その主要成分であるアルテピリンC(Art-C)を介して抗CD3抗体刺激脾細胞の炎症性サイトカインを抑制する一方でIL-2産生を顕著に促進し、抑制性サイトカインを促進することを示してきた(Tsuruta H, 2022)。

一方、中国産プロポリス(CP)の主要成分であるカフェイン酸フェネチルエステル(CAPE)も、刺激脾細胞の炎症性および抑制性サイトカイン産生に対して、Art-Cとよく似た制御を行うことが判明し(Ando M, 2023)、さらに CAPEがIL-2を介してIL-4およびIL-10産生を促進していることを明らかにした(Takahashi M, 2024)。

本研究では、Art-Cによる刺激脾細胞の炎症性サイトカインおよび抑制性サイトカインであるTh2サイトカイン産生におよぼす影響を評価し、抗IL-2中和抗体を用いて、それらサイトカイン産生に関与するIL-2の機能について検討した。その結果、Art-Cは刺激脾細胞においてIL-2を介してIL-4、IL-10などのTh2サイトカイン産生を促進することと、IL-5、IL-13産生を抑制するが、これらの産生は部分的にIL-2の機能によりその産生が維持されていることが判明した。

以上の結果よりArt-CはIL-2を介する系と介さない系でTh2サイトカイン産生を特異的に制御することが示唆された。

MP1-41 「LepR 陽性歯根膜細胞の性状および長期的動態解析」

Satsuki Shidara¹、溝口 利英²(¹ 東歯大 矯正、² 東歯大 口腔科学研究セ)

【目的】我々はレプチン受容体(LepR)陽性細胞が歯根膜(PDL)に局在し、歯周組織の硬組織維持に寄与することを報告した。本研究ではLepR-CreERマウスの1年に亘る細胞系譜解析と1細胞解析からLepR⁺PDL細胞の性状の解明を目的とした。

【方法】LepR-CreER;R26tdTomato(Tom)マウス(2週齢)に40H-タモキシフェン(100 mg/kg)を3日間投与してLepR⁺細胞をTom蛍光で標識し(LepR-Tom⁺細胞)、2日、2カ月、半年、1年後に上顎第一臼歯部の凍結切片を観察した。また、LepR-Cre;R26-tdTom;Runx2-GFPマウスの上顎臼歯周囲PDLを回収し1細胞解析を行った。

【結果】<細胞系譜解析>標識2日後のPDLにLepR-Tom⁺細胞を認めたが、骨細胞(OCY)とセメント細胞(CM)には認められなかった。LepR-Tom⁺細胞由来OCYとCMはそ

れぞれ2カ月後と半年後をピークに増加してその後減少した。1年後ではLepR-Tom⁺細胞由来OCYは存在したが、CMは認められなかった。

<1細胞解析>PDLにおけるLepR⁺細胞はRunx2⁺とRunx2⁺の2集団に分類された。擬時間解析の結果、LepR⁺Runx2⁺細胞がLepR⁺Runx2⁺細胞を介してセメント芽細胞(CB)と骨芽細胞(OB)に分化することが示された。またLepR⁺Runx2⁺細胞集団では他のPDL集団やCB/OB集団より破骨細胞誘導因子RANKLの高発現傾向を認めた。

【考察】LepR⁺PDL細胞の長期に亘る硬組織形成細胞への寄与が示された。また、CMの供給源は加齢に伴いLepR⁺PDL細胞から他の細胞にシフトすることが示唆された。

MP1-42 「Erythromyeloid progenitor-derived osteoclast precursors provide the main source of neonatal osteoclasts essential for tooth eruption.」

李 若萱¹、何 治鋒¹、中道 裕子¹、宇田川 信之¹、小林 泰浩¹(¹Matsumoto Dent Univ, Inst Oral Sci)

Osteoclast precursors (OCPs) can be derived from not only hematopoietic stem cells (HSC) but also erythromyeloid progenitors (EMP). Our investigation focuses on the EMP-derived OCPs that give rise to osteoclasts (OCs) with functional distinctions compared to HSC-derived OCs. Here, temporally controlled conditional gene knockout experiments revealed that deletion of RANK in OCPs in the speculate mid embryonic stage suppressed osteoclastogenesis in the bone marrow with narrowed cavities on postnatal day 0 mice. Through generation of RANK-Cre; Csf1r cKO mice, EMP-derived macrophages are specifically eliminated, whereas HSC-derived macrophage

development is normal. Genetic ablation of EMP-derived OCPs suppressed the osteoclastogenesis and decreased the bone marrow cavity area. However, OCs gradually appeared and bone marrow cavities also expanded with a delay. Meanwhile, the three-to-four-week-old mice exhibited absent or incomplete tooth eruption. Taken together, EMP-derived OCPs are critical for osteoclastogenesis in neonatal period, and directly contribute to the formation of bone marrow cavity. Moreover, EMP-derived OCPs differentiate into OCs required for the tooth eruption.

MP1-43 「The environmental glutamine induces cross-regulation of glucose and glutamine in the growth and metabolism of normal and oral squamous cell carcinoma cells.」

Shan Liu¹、Jumpei Washio¹、Nobuhiro Takahashi¹

(¹ 東北大 院歯 口腔生化)

Background:Our previous study has suggested a link between glutamine and glucose metabolism in cancer cells, but the effects of glutamine on their growth and glucose metabolism remains poorly explored.

Methods:Normal (HaCaT) and oral squamous cell carcinoma (HSC-2 and HSC-3) cells were cultured in medium (containing 1 g/L glucose) supplemented with glutamine (0, 0.25, 0.5, 1, and 2 mM) to evaluate the effect of glutamine on the growth. The effect on glucose metabolic activity by cells after 24 h and 72 h (HSC-2 and HSC-3)/48 h (HaCaT) of culture was also evaluated.

Results and conclusions:Glutamine significantly

enhanced growth in all cells. Glucose metabolic activity tended to decrease depending on glutamine concentration during 24 h of culture, and continued to decrease even after 72 h in HSC-2 and HSC-3, whereas glucose metabolic activity recovered and even increased after 48 h in HaCaT. These results suggest that cancer cells adapt to use glutamine instead of glucose as a cellular material and energy source (shift to glutaminolysis), whereas normal cells continue to use glucose as an energy source and glutamine as a cellular material, even at high glutamine concentrations.

日時：9月5日（金）12:50～18:30

会場：ポスター会場（会議場1階 イベントホール）

モリタ優秀発表賞審査「薬理・病理学」（MP1-44～51）

MP1-44 「抗酸化機構を標的とした4-オクチルイタコン酸による抗腫瘍作用」

佐伯 彩華¹、林 慶和^{1・2・3}、吉本 尚平^{3・4}、平田 雅人³、自見 英治郎^{1・5}、
安河内（川久保）友世¹（¹九大 院歯 OBT 研究セ、²福歯大 機能構造、³福歯大 口腔医学研究セ、
⁴福歯大 病態構造、⁵九大 院歯 口腔細胞工学）

クエン酸回路において産生されるイタコン酸（IA）は炎症制御因子として知られているが、近年、がん進展機構にも寄与している可能性が報告されている。従来、IAの機能解析には、4-オクチルイタコン酸（OI）などのIA誘導体を使用されてきたが、IAとOIの生理活性の違いは不明である。そこで本研究では、メラノーマ細胞に対するIAとOIの抗腫瘍効果について解析した。

培養細胞を用いた実験では、細胞外に添加したIAやOIは細胞内に取り込まれ、OIの一部はIAに変換されることがLC-MS/MS解析で明らかになった。また、OI添加によって増殖抑制効果が認められたが、IAは細胞増殖活性に影響を及ぼさなかった。RNA-seq解析により、

OI処理でグルタチオン代謝異常が生じる可能性が示唆され、その後の解析から、OIによる細胞内グルタチオンの枯渇、活性酸素種の蓄積、DNA損傷、細胞老化、ミトコンドリアの酸化的リン酸化阻害などが確認された。なお、OIは正常メラノサイトの細胞増殖活性にはあまり影響を及ぼさなかった。さらに、担がんマウスに対するOI腹腔内投与は腫瘍の増殖を有意に抑制し、*in vitro*と同様の機序で増殖を抑制することが確認された。

以上より、OIはIAとは異なる生理活性をもつこと、また、OIは抗酸化システムの破綻とミトコンドリア機能障害を介してメラノーマ細胞の増殖を抑制することが示唆された。

MP1-45 「歯周病モデルマウスでは歯槽骨吸収に伴い根尖部周辺の骨形成が誘導される」

上川 正悟^{1・2・3}、唐川 亜希子^{2・3}、畔津 佑季^{2・3}、茶谷 昌宏^{2・3}、池田 めぐみ⁴、
山本 松男¹、高見 正道^{2・3}（¹昭医大 歯 歯周病、²昭医大 歯 歯科薬理、³昭医大 歯 薬理科学研、
⁴昭医大 歯 歯内治療）

【目的】本研究では、歯周病モデルマウスを用いて歯槽骨吸収のメカニズムを解析した。その結果、歯槽骨吸収の進行に伴って新たな骨組織が根尖周囲に形成され、それが抗RANKL抗体によって抑制されることを見出したので報告する。

【方法】1. 歯周病モデルマウス ①辺縁性歯周炎：上顎右側第二臼歯に絹糸を結紮し14日後に上顎骨のμCT解析、組織学的解析、および遺伝子発現解析を行った。②根尖性歯周炎：上顎右側第二臼歯の咬合面に窩洞を形成し露髄させ、14日後に上記と同様の解析を実施した。2. 抗RANKL抗体投与：①と②のマウスに抗マウスRANKL抗体を施術直後と7日後に投与した。

【結果】①および②の両マウスにおいて、7日後に軽度

の歯槽骨吸収と根尖部周辺の骨形成が認められ、14日後には骨吸収と骨形成が亢進していた。組織染色では破骨細胞（TRAP陽性）と骨芽細胞（ALP陽性）が根尖部の固有歯槽骨と新生骨に認められた。抗RANKL抗体は、破骨細胞形成阻害により歯槽骨吸収を抑え、それに伴って新生骨形成も抑制された。①と②では形状に違いがあるがいずれも新生骨が認められた。RANKL、Cathepsin K（破骨細胞マーカー）およびRUNX2、ALP（骨芽細胞マーカー）の発現レベルの上昇傾向を認めた。

【考察】歯周病が骨吸収だけでなく骨形成を誘導することを見出した。抗RANKL抗体がこれを抑制したことから、炎症条件下に特有の破骨細胞と骨芽細胞のカップリング機構が存在すると予想される。

MP1-46 「軽症型低ホスファターゼ症モデルマウスにビスホスホネート製剤を投与すると骨の治癒不全が生じる」

平井 研吾¹、高橋 有希²、石束 叡³、新谷 誠康¹、笠原 正貴²
(¹東歯大 小児歯、²東歯大 薬理、³東歯大 解剖)

【目的】低ホスファターゼ症（HPP）は、組織非特異的アルカリホスファターゼ遺伝子の変異により発症する遺伝性疾患で、長管骨の低形成や乳歯の早期脱落などを主徴とする。軽症型HPPでは明確な症状が乏しく、骨粗鬆症と誤診されることがある。その結果、骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネート製剤（BP）が誤って投与され、非定型骨折が生じたとの報告がある。そこで本研究は、BPが軽症型HPPモデルマウス（Akp2^{+/-}マウス）の下顎骨に与える影響を検討した。

【方法】4週齢のAkp2^{+/-}マウスにゾレドロン酸（Zol）1 mg/kgを週1回、計5回の皮下投与を行い、9週齢で下顎

骨を摘出した。一方、Zol投与下のマウス下顎骨に直径1 mmの円形欠損を付与し、12週齢で骨治癒を評価した。対照群としてAkp2^{+/+}マウスを用いた。

【結果および考察】Zol投与による下顎骨の骨量の増加はAkp2^{+/+}マウスのみで認められた。また、Zol投与後に骨欠損を形成した結果、Akp2^{+/-}マウスでは仮骨形成が著しく抑制されていた。これらの結果から、軽症型HPPにおいてBPが骨修復に悪影響を及ぼす可能性を示しており、HPPと骨粗鬆症の鑑別診断の重要性が示唆された。

MP1-47 「骨再生におけるスフィンゴ糖脂質の役割 - 頭蓋冠骨欠損モデルマウスを用いて -」

佐奈 愛梨^{1,2}、長尾 麻由¹、佐藤 琢麻²、宮澤 健²、濱村 和紀¹
(¹愛院大 歯 薬理、²愛院大 歯 矯正)

【目的】細胞膜に存在するスフィンゴ糖脂質は細胞増殖、分化、細胞間情報伝達に関与している。我々は、スフィンゴ糖脂質の1種であるGb4が骨芽細胞に発現していること、またGb4が欠損しているGb3合成酵素遺伝子欠損（Gb3S K0）マウスでは、骨芽細胞数が減少することで骨形成が抑制され、骨量が減少することを見出した。しかし、Gb4が新生骨形成において果たす役割は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、Gb4が欠損しているGb3S K0マウスを用いて骨欠損部の新生骨形成にGb4が及ぼす影響を検討することとした。

【試料および方法】8週齢のGb3S K0マウスと野生型（WT）マウスの頭蓋冠から骨芽細胞を採取し、それぞれの骨芽細胞におけるGb4の発現をフローサイトメトリーに

て検討した。次に、8週齢のGb3S K0マウスとWTマウスの頭蓋冠に直径5 mmの円形骨欠損窩洞を穿孔し、頭蓋冠骨欠損モデルマウスを作成した。術直後と術後12週でマウス頭部をμ-CT撮影し、それぞれの骨欠損部における骨閉鎖率、新生骨形成量を比較検討した。

【結果】WTマウス由来の骨芽細胞ではGb4の発現が認められたが、Gb3S K0マウスでは認められなかった。また術後12週においてGb3S K0マウスでは、WTマウスと比較して骨閉鎖率、新生骨形成量が有意に低下した。

【結論】本研究より、Gb3S K0マウスではWTマウスと比較して骨閉鎖率、新生骨形成量が有意に低下していたことから、Gb4が骨再生に関与することが示唆された。

MP1-48 「miR-15b-5p はマクロファージのM1 分極を促進する」

園山 卓¹、佐野 朋美¹、溝上 顕子²、兼松 隆¹
(¹九大 院歯 口腔機能分子、²九大 院歯 OBT 研究セ)

マクロファージは、炎症性のM1マクロファージ（M1）や抗炎症性のM2マクロファージ（M2）に分極する。炎症組織では、M1が有意に存在することから、マクロファージの分極機構の解明は炎症の制御につながる。本研究では、M1分極により発現が大きく変動するmicroRNA（miR-15b-5p）がM1分極に与える影響につい

て明らかにすることを目的とした。

マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7をM1に分極させるとmiR-15b-5pの発現は有意に低下した。RAW264.7にmiR-15b-5pを導入し、LPSとINF-γでM1分極を誘導するとNF-κB経路（p65のリン酸化）が亢進し、iNOS、TNF-αの発現が増加した。また、LPSまたはINF-

γ の単独刺激では、miR-15b-5p導入によりLPS誘導性のNF- κ B経路が亢進したがIFN- γ 誘導性のJAK-STAT経路は亢進しなかった。そこで、NF- κ Bシグナルの関連分子に着目しmiR-15b-5pの標的遺伝子を探索した。IRAK-Mは、コントロール群と比較してmiR-15b-5p導入で有意

に発現抑制された。よってIRAK-MがmiR-15b-5pの1つの標的分子である可能性が示唆された。

以上より、マクロファージのM1分極を促進するmiR-15b-5pは、炎症制御の新たなアプローチになると考えられる。

MP1-49 「エナメル質形成における多価飽和脂肪酸パルミチン酸の影響」

中川 真舞¹、水澤 典子²、岩脇 有軌³、工藤 保誠²、田中 栄二¹

(¹徳大 院医歯薬 顎顔面矯正、²徳大 院医歯薬 口腔生命、³徳大 院医歯薬 補綴)

【目的】エナメル質形成不全はう蝕の原因となる他、変色などによる審美的問題をも生じる。エナメル質は、乳歯では母胎の妊娠7週以降、永久歯は妊娠3ヶ月から数年の間に形成されるため、母胎および学童期までの栄養状態が影響すると考えられた。本研究では、多価飽和脂肪酸として血中に多く存在するパルミチン酸の、ヒトエナメル芽細胞における影響を検討した。

【方法】エナメル上皮腫由来ヒト細胞株HAM3を用い、パルミチン酸(50 μ M, 24時間)処理後RNAを抽出し、マウスエナメル質形成不全症関連遺伝子約60種類を含めたamelogenesisプライマーセットによるqRT-PCRアレイ解析を行った。

【結果】HAM3細胞において、93種類のうち、有意差検定により21種類(*TUFT*, *AMBN*, *AMTN*, *BMP2*, *CLDN*, *CNNM4*, *GDNF*, *IRF6*, *ITGB1*, *LAMB3*, *RUNX1*, *SMAD3*, *FOXJ1*, *PLAU*, *IL1 α* , *IL1 β* , *IL6*, *TNF α* , *GDF15*, *HBEGF*, *PPAR δ*)の遺伝子発現が上昇し、3種類(*BCL11B*, *PITX2*, *TGFB1*)および、常時活性型で低石灰化に關与する*HRAS*の発現は低下していた。

【考察】HAM3細胞では、基質タンパク質の遺伝子発現が上昇する傾向が認められ、パルミチン酸処理によってエナメル芽細胞の分化が誘導される可能性が示唆された。

MP1-50 「神経向性口腔癌細胞株に高発現する non-coding RNA の解析」

埴 太宥¹、工藤 朝雄¹、西村 俊輝^{1,2}、佐藤 かおり¹、田谷 雄二¹、添野 雄一¹

(¹日歯大 生命歯 病理、²日歯大 生命歯 保存)

【背景と目的】口腔扁平上皮癌(OSCC)における神経周囲浸潤(PNI)は予後不良に關与する。PNIの詳細な分子機序は不明であるが、タンパク質をコードしないnon-coding RNA(ncRNA)は、RNA結合タンパク質と協働して多様な機能を担うことが知られており、PNI機序への關与が想定される。本研究では、神経親和性の異なるOSCC細胞株群のRNA-seqデータを用いてPNIに關わるncRNAの解析を行った。

【材料と方法】神経向性を示すH0-1-u-1を含む7種のヒトOSCC細胞株のRNA-seqデータを用いてH0-1-u-1特異的遺伝子を検索した。得られた候補分子については、5種のOSCC細胞株およびヒト不死化ケラチノサイトのqPCRで発現を検証した。さらに、変異解析、細胞分画

による局在解析、RNA-protein pull-downアッセイおよび質量分析によるタンパク質同定を組み合わせncRNA機能を追究した。

【結果および考察】H0-1-u-1で高発現する遺伝子群のうち19.3%がncRNAであった。特に、small nucleolar RNAの*SNORA36B*は、qPCRで高発現を確認でき、頭頸部扁平上皮癌症例ではその高発現が予後不良と關した。RNA配列上に変異はなかったが、核内偏在性およびpull-downアッセイの結果から、*SNORA36B*が既知のrRNA修飾やスプライシング制御に加えて、神経親和性を特徴づける細胞機能制御に關与している可能性が示唆された。

本研究はJSPS科研費#24K23635の助成を受けた。

MP1-51 「ホルマリン固定パラフィン包埋検体の口腔細菌叢解析への応用可能性について」

佐野 拓人¹、佐藤 拓一²、東理 頼亮¹、大野 淳也¹、岡田 康男¹(¹ 日歯大新潟 病理、² 新潟大 院保健 臨床科学)

【目的】ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体を細菌叢研究に応用することで、過去の膨大な数の検体を用いた遡及的な研究が可能となる。しかし、FFPE検体ではホルマリン固定に起因する検体中DNAの損傷が見られる。本研究では、FFPE検体作製過程が検体中の細菌DNA及び細菌叢解析（メタ16S解析）結果に与える影響を検証することを目的とした。

【方法】9名の被験者から安静時唾液を採取し、唾液を遠心して得られたペレットからFFPE検体を作製した。新鮮唾液検体と唾液のFFPE検体中の細菌16S rRNA遺伝子の可変領域V1-9、V1-2、V3-4の存在量を相対的に比較した。また、メタ16S解析を行い、2つの検体タイプの結果を比較した。加えて、26個の口腔扁平上皮癌の

FFPE検体を用いたメタ16S解析を行った。

【結果と考察】FFPE検体では細菌叢解析のための標的となる細菌の16S rRNA遺伝子が断片化することが示された。しかし、V1-2領域（約300bp）はV1-9領域（約1500bp）やV3-4領域（約450bp）と比較してよく保存されていた。加えて、新鮮検体とFFPE検体の間で細菌叢の α 多様性および β 多様性に有意差はなく、細菌叢構成は類似していた。口腔扁平上皮癌のFFPE検体からは品質フィルタリング後に平均28598リードが得られた。FFPE検体を用いた口腔細菌叢解析においては、16S rRNA遺伝子のV1-2領域等の短い領域が解析に適しており、これら領域を標的としたFFPE検体による口腔細菌叢解析の可能性が示された。

日時：9月5日（金）12:50～18:30

会場：ポスター会場（会議場1階 イベントホール）

モリタ優秀発表賞審査「微生物学」（MP1-52～70）

MP1-52 「エリスリトール・硝酸カリウム併用が *Neisseria* 属増加を伴う健康型口腔フローラを形成する」赤津 友基¹、藤井 明彦¹、惣野 初美¹
(¹ 花王 ヒューマンヘルスケア研)

【目的】歯周病は口腔菌叢のdysbiosisが関与する。我々は軽度歯周病時の歯肉縁下では硝酸還元菌が減少するとともに、良好な歯周組織を保つ高齢者では硝酸還元菌が豊富な菌叢を形成していることを報告した。さらに、硝酸還元菌の一種*Neisseria*に歯周病菌の感染阻害作用があることを見出した。これらの知見を踏まえ、*Neisseria*に着目した健康型口腔フローラ形成方法の開発を検討した。

【検討1：歯垢BFモデル評価】歯垢*ex vivo* BFモデルと16S rRNA解析を用いて*Neisseria*を増加させる有効成分を探索した。その結果、エリスリトール（Ery）と硝酸カリウム（KN03）併用で*Neisseria*と*Haemophilus*属菌種の増加が認められた。このとき*Streptococcus*の減少を伴い、培養上清中の乳酸濃度低下とpH低下抑制も

確認された。

【検討2：ヒト有効性試験】花王（株）社員を対象に2週間の二重盲検RCTを実施した。Ery+KN03洗口剤の使用で唾液中の*Neisseria*が有意に増加し、*Prevotella*の減少が認められた。また、*Neisseria*の変化率は*Prevotella*、*Saccharibacteria*（TM7）[G-1]、*Streptococcus*等の変化率と負相関を示した（ $r < -0.4$ ）。

【考察】EryとKN03の併用は、*Neisseria*の増加を伴い歯周病菌やう蝕菌を抑制する可能性が示された。*Neisseria*は主要な硝酸還元菌の一種であることから、EryとKN03の使用は硝酸還元菌優位な健康型口腔フローラ形成を促し、予防歯科のさらなる発展に寄与する可能性がある。

MP1-53 「*Stenotrophomonas maltophilia* の口腔内からの分離と性状解析に関する包括的な報告」西濱 早紀¹、松尾 美樹²、柴 秀樹¹、小松澤 均²(¹ 広大院医系科学 歯髄生物、² 広大院医系科学 細菌)

*Stenotrophomonas maltophilia*は多剤抗菌薬耐性を有する院内感染の起炎菌として知られており、菌血症や呼吸器感染症における粗死亡率は時に50%を超える。我々の研究室では、第65回歯科基礎医学会学術大会にて、ヒト口腔に多剤耐性*S. maltophilia*が高い割合で常在することを報告した。これは、口腔多剤耐性*S. maltophilia*による血流感染や誤嚥性肺炎による敗血症を惹起する可能性を示唆している。本研究では、口腔由来多剤耐性*S. maltophilia*の特徴を解明する目的で、口腔から分離した臨床分離株30株の性状解析及びRNA sequence解析を行った。結果、全ての株はバイオフィルムを形成し、

形成量に多様性を認めた。自己凝集や人工唾液凝集は菌株特異性があり、*Streptococcus mutans*等の口腔内細菌と共凝集した。遺伝子発現解析の結果、バイオフィルム形成と凝集は、鞭毛やIV型線毛の形態と運動関連因子の遺伝子発現と関連する可能性が示唆された。本研究では口腔由来*S. maltophilia*の性状および関連因子に関して、知り得る限り初めての包括的報告を行った。本研究結果から、口腔は*S. maltophilia*がヒト感染症を引き起こす重大な潜伏先である可能性があり、口腔は感染制御において重要であることが示唆された。（会員外共同研究者：鈴木 優仁、Vo Minh Ngoc、川柳 智暉）

MP1-54 「口腔細菌叢の細菌構成と腸内細菌叢の多様性および細菌構成との関連性解析」

山 和馬¹、南木 悠²、堤 康太¹、翠川 優希²、近澤 貴士¹、牧 利一¹、竹田 綾²
 (1 ライオン (株) 研究開発本部、² (株) サイキンソー)

【目的】口腔と腸の細菌叢の関係性を明らかにするため、先行文献に基づき分類した2タイプの口腔細菌叢とそれらに特徴的な5属、う蝕・歯周病関連菌に注目し、腸内細菌叢との関連を解析した。

【方法】247名から唾液と糞便を採取し16S rRNA遺伝子V1-V2領域を測定。各属・種の組成比とシャノン多様性指数を算出し、関連性を解析した。

【結果】先行知見と同様に口腔細菌叢は、*Veillonella*属やう蝕関連細菌*S. mutans*の比率が高いタイプ1と、*Neisseria*属比率が高いタイプ2に分類された。各タイプと腸内細菌叢の多様性(腸内では多様性が高いと安定的で良いとされる)との関連解析の結果、タイプ1であると多様性が低く、タイプ2は多様性が高い関係を

見出した。また、タイプ1に特徴的な*Veillonella*は、口腔で比率が高いと腸内から検出されやすく、腸内の多様性が低いこと、*S. mutans*は、口腔で検出されると腸内でも検出されやすいことを明らかにした。一方、タイプ2に特徴的な*Neisseria*は、腸内でほとんど検出されず、口腔で比率が高いと腸内の多様性が高い関係を明らかにした。これら結果は、口腔の細菌構成と腸内の多様性が関連する可能性を示しており、先行文献にて*Neisseria*が特徴的なタイプは口腔疾患リスクが低い可能性が示されていることを考慮すると、口腔疾患リスクが低い状態と、腸内の多様性が高く安定的な状態が関連する可能性が考えられる。

MP1-55 「D- アミノ酸によるう蝕・歯周病原細菌のバイオフィーム形成抑制に関する検討」

川野 亜希¹、八木 孝和¹、黒野 剛²、吉村 徹²、吉田 幸恵¹
 (1 神常大 口腔保健、² D アミノ酸ラボ株式会社)

生体内のアミノ酸は主にL体で構成されているが、近年、D体アミノ酸も様々な生理機能を持つことが報告されている。特に、D-セリンは神経伝達、D-アスパラギン酸はホルモン調節に関与し、D-アラニンやD-トリプトファンは免疫応答や感染防御に関与することが注目されている。本研究では、D-アミノ酸が歯科疾患の主要な原因菌に与える影響を明らかにし、う蝕・歯周病に対する新たな治療法の可能性を検討した。供試菌には*Streptococcus mutans* (*S. m.*) および*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) を使用し、D-セリン、D-アラニン、D-アスパラギン酸を用いて、最小発育阻

止濃度(MIC)および最小殺菌濃度(MBC)を測定した。さらに、クリスタルバイオレット染色法によりバイオフィーム形成能への影響を評価した。その結果、D-アスパラギン酸は両菌種に対して濃度依存的に抗菌およびバイオフィーム形成阻害効果を示し、*S. m.*ではMICが12.5 mM、MBCが250 mM、*A. a.*ではMICが31.3 mM、MBCが250 mMと推定された。一方、D-セリンおよびD-アラニンには有意な効果は認められなかった。これらの結果から、D-アスパラギン酸は歯科領域における細菌感染症に対する新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。なお、本研究成果は特許出願中である。

MP1-56 「口腔細菌 *Streptococcus oralis* の単一感染モデルマウスが引き起こす膀胱炎症の病態生理学的解析」

飯岡 康太¹、森崎 弘史²、深町 はるか²、立川 哲史¹、増田 陸雄¹、桑田 啓貴²
 (1 昭医大 歯 全身管理 麻酔、² 昭医大 歯 口腔微生物)

【目的】口腔内常在細菌である*Streptococcus oralis*は、プラーク形成に寄与する初期定着菌として知られている。一方で、観血的処置や誤嚥により血中や気道に侵入し、心内膜炎や誤嚥性肺炎を引き起こす可能性が示唆されているが、*S. oralis*単独での病態誘導の仕組みは不明である。本研究では、*S. oralis*を用いたノトバイオームモデルマウスを作成し、宿主への影響、特に膀胱炎

症への影響を調べた。

【方法】*S. oralis*を無菌Balb/cマウスに投与し、生まれた仔マウスをノトバイオームマウスとした。各臓器における菌の分布および腸管粘膜の組織学的評価を行った後、膀胱の組織学的評価と排尿パターンを調査した。膀胱組織の遺伝子発現変化は、次世代シーケンサーによるRNAシーケンスおよびqRT-PCRで評価し、膀胱

粘膜下の免疫細胞はフローサイトメトリーで解析した。

【結果と考察】*S. oralis*単独定着マウスでは、口腔に加えて腸管でも菌が検出されたが、血中、肺、膀胱では検出されなかった。軟便や頻尿などの症状が観察され、病理学的解析により膀胱組織の萎縮や浮腫が確認され

た。膀胱組織のbulk RNA発現解析では、慢性炎症関連遺伝子の発現上昇と抗酸化関連遺伝子の発現低下が認められた。以上の結果から、無菌マウスへの*S. oralis*単独感染により、間質性膀胱炎様症状が誘発されることが示唆された。

MP1-57 「*Streptococcus mutans* 感染における自然免疫応答の解析」

岩沼 青葉^{1,2}、豊永 憲司^{1,3}、永尾 潤一^{1,3}、岸川 咲吏^{1,3}、岡 暁子^{2,3}、
田中 芳彦^{1,3}

(¹ 福歯大 機能生物 感染生物、² 福歯大 成長発達 小児歯、³ 福歯大 口腔医学 研究セ)

口腔内に様々な病原微生物が存在していることは広く知られているが、宿主免疫を介してう蝕や歯周病などの病態に至る機構には不明な点が多い。病原体感染に対する宿主防御応答では、まずマクロファージや樹状細胞といった自然免疫細胞が重要な役割を担うが、これらの細胞には病原体センサーとして様々な自然免疫受容体が発現している。これらの受容体はPAMPsと呼ばれる病原体に特徴的な繰り返し構造を認識することから、パターン認識受容体 (PRRs) とも呼ばれる。その解析はToll様受容体 (TLRs) を中心に展開されて

きたが、NOD様受容体 (NLRs) やRIG-I様受容体 (RLRs) などいくつかの受容体ファミリーも加わり、認識するリガンドに関してもタンパク質や核酸、糖鎖など多岐にわたることが明らかとなってきた。

我々は、う蝕原性細菌として知られるミュータンス連鎖球菌*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) による自然免疫活性化に、アダプタータンパク質CARD9が寄与していることを見出した。本演題では、CARD9上流の*S. mutans*認識受容体やそのリガンド、およびう蝕形成におけるCARD9の役割について議論したい。

MP1-58 「*mfa2* 挿入変異により伸長した Mfa1 線毛を発現する *Porphyromonas gingivalis* トランスポゾン変異体の同定」

三輪 尚慶^{1,2}、藤本 実結菜^{1,2}、榮 宏太郎²、岩瀬 智彦²、廣畑 誠人²、内記 良一²、
西川 清²、名和 弘幸¹、長谷川 義明²

(¹ 愛院大 歯 小児歯、² 愛院大 歯 微生物)

【目的】*Porphyromonas gingivalis*はmfa1-5オペロンにコードされるMfa1~Mfa5から構成されるMfa1線毛を有する。Mfa1をコードするmfa1はその配列の多様性により70A型、70B型、及び53型に分類され、70A型Mfa1は約70-kDaの分子量を示す。70A型に分類される標準株のMfa1線毛は100nm程度の長さで菌体表面に強固に結合している。近年、我々は73-kDaのMfa1を発現するD83T3株を新たに同定した。本研究では同株におけるMfa1線毛の特徴を明らかにし、mfa1型分類法の確立に資することを目的とした。

【方法】菌体及び培養上清中のMfa1をウエスタンブロット法により検出した。菌体におけるMfa2の発現や精製線毛中に含まれるMfa3~Mfa5の検出も行った。精製Mfa1線毛を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した。

D83T3株ドラフトゲノムで未決定であったmfa1下流領域の塩基配列をダイターミネーター法により決定した。

【結果】D83T3株では、73-kDaのMfa1が培養上清中で強く検出された。TEM観察では1μm以上に伸長した線毛構造が確認された。Mfa2の発現は著しく低下しており、精製線毛中にMfa3~Mfa5は検出されなかった。塩基配列解析の結果、D83T3株のmfa1-mfa2間にトランスポゾンが逆向き挿入されていた。

【考察】D83T3株では、トランスポゾン挿入によりmfa2が不活化され、それに伴い異常に長いMfa1線毛が形成されたと考えられる。本株の特徴は、Mfa1線毛の構造形成におけるMfa2の重要性を示唆している。

MP1-59 「マクロライド誘導体 EM982 の Toll-like receptor 2 シグナルに対する作用解析」

齋藤 瑠郁^{1,2}、土門 久哲^{1,3}、磯野 俊仁¹、寺尾 豊^{1,3}(1)新潟大 院医歯 微生物、²新潟大 院医歯 う蝕、³新潟大 院医歯 高度口腔)

【背景】マクロライド系薬は免疫調節作用を有し、非細菌性の炎症疾患に対しても有効である。しかし、抗菌薬であるが故に頻用には耐性菌出現のリスクが伴う。エリスロマイシン誘導体のEM982は、抗菌性を有さない構造に改変したため、耐性菌を誘発させるリスクが少ない。一方で、マクロライド系薬としての免疫調節作用は保持しており、Toll-like receptor (TLR) 4下流のシグナル伝達分子のリン酸化を抑制、転写因子NF- κ Bの活性化を調節する。本研究ではさらに、TLR2シグナルに対するEM982の影響を解析した。

【方法と結果】TLR2を強制発現するHEK293細胞に、EM982とPam3CSK4 (TLR2/1リガンド) またはFSL-1 (TLR2/6リガンド) を混合添加して培養し、NF- κ Bの活性化に伴い分泌されるアルカリホスファターゼ (SEAP) の活性

を測定した。その結果、各リガンドを単独添加した群と比較して、EM982を混合添加した群ではSEAP活性が有意に低かった。続いて、THP-1細胞にEM982と各TLR2リガンドを混合添加して培養し、培養上清中のサイトカイン濃度をELISAで測定した。その結果、各リガンドを単独添加した群と比較して、EM982を混合添加した群において、炎症性サイトカインIL-6、TNF- α およびIL-8濃度が有意に低かった。

【考察】EM982はTLR2下流のNF- κ B活性化を抑制し、炎症局所のサイトカイン産生を調整することが示唆された。

会員外共同研究者:砂塚敏明、廣瀬友靖、池田朱里 (北里大学)

MP1-60 「*Filifactor alocis* による骨芽細胞からの IL-6 産生と破骨細胞分化誘導」鶴田 侑万^{1,2}、Tongxin Liu^{1,3}、横井 春奈^{1,4}、西岡 貴志^{5,6}、多田 浩之¹(1)東北大 院歯 口腔微生物・免疫、²東北大 病院 卒後研修セ、³東北大 歯、⁴獨協医大埼玉医療セ 共同研究セ、⁵東北大 院歯 リエゾン、⁶東北大 病院 顎口腔画像)

【緒言】歯周病原細菌*Filifactor alocis*は、破骨細胞の活性化により歯周炎の病態形成に関わるが、本菌による骨芽細胞への影響は不明である。本研究は、*F. alocis*による骨芽細胞の炎症誘導ならびに*F. alocis*による骨芽細胞の活性化を介した破骨細胞分化誘導について検討した。

【材料と方法】マウス骨芽細胞株MC3T3-E1をアスコルビン酸含有培地で骨芽細胞へと分化させた。*F. alocis*をBHI培地で嫌気培養した。*F. alocis*生菌、凍結乾燥全菌体およびextracellular vesicles (EVs) 刺激による同細胞のサイトカイン産生をELISA、mRNA発現をRT-qPCRで測定した。また、マウス骨髄細胞由来マクロファージをM-CSF、RANKLとともに*F. alocis*で刺激した骨

芽細胞の培養上清で処理し、破骨細胞分化誘導をTRAP染色で検出した。

【結果】*F. alocis*は骨芽細胞のIL-6 mRNA発現ならびにTLR2依存的にIL-6産生を著明に誘導した。興味深いことに、セルカルチャーインサートを用いて*F. alocis*と骨芽細胞の物理的接触を遮断してもIL-6産生は観察された。また、*F. alocis*で刺激した骨芽細胞の培養上清は破骨細胞分化を著明に誘導した。

【考察】*F. alocis*は骨芽細胞のIL-6産生ならびに骨芽細胞を介した破骨細胞分化を誘導する。歯周炎において、*F. alocis*は骨芽細胞に炎症を誘導し、破骨細胞分化を誘導する可能性が示唆される。

MP1-61 「マクロファージ分泌タンパク質 AIM が肺炎球菌に及ぼす影響の解析」

安井 惟人^{1,2}、平山 悟¹、土門 久哲^{1,3}、寺尾 豊^{1,3}(1)新潟大 院医歯 微生物、²新潟大 院医歯 歯周診断・再建、³新潟大 院医歯 高度口腔)

【目的】わが国では、誤嚥性肺炎を含む肺炎により毎年10万人以上が死亡する。肺炎重症化機序を解明するた

め、肺炎球菌感染マウスの肺胞洗浄液をプロテオーム解析し、感染時に増加する宿主タンパク質群を同定し

た。その中から、マクロファージ由来のAIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) に着目した。AIMは様々な疾患に関連することが知られているが、肺炎球菌性肺炎との関連については報告がない。本研究では、肺炎球菌感染におけるAIMの機能を検索した。

【方法と結果】 AIMと肺炎球菌の結合性を調べるため、菌体に組換えAIMを添加し、菌体画分をウェスタンブロット (WB) した。AIMをCa²⁺及びBSAと共に添加した場合のみ、菌体画分からAIMが検出された。次に、U937マクロファージ細胞に肺炎球菌を添加し、貪食された菌数をコロニーカウント法で測定した。AIM添加

群では非添加群に比較して有意に多くのコロニーを確認した。肺炎球菌は好中球を傷害しエラスターゼ (NE) を漏出させることが知られている。AIMとNEを混合しWBすると、AIMは検出されなかった。

【考察】 AIMはCa²⁺とBSAの存在下で肺炎球菌と結合し、マクロファージによる貪食を促進することが示唆された。また、肺炎球菌感染に伴い放出されるNEは、AIMを分解することが示された。これらの結果から、感染時にAIMを補充することで、肺炎球菌の除去を促進し、肺炎重症化を抑制できる可能性が考えられる。

MP1-62 「空間トランスクリプトミクスによる細菌性肺炎の重症化機構の解析」

石本 由祐^{1,2}、工藤 保誠³、田中 栄二²、住友 倫子¹

(¹ 徳大 院医歯薬 口腔微生物、² 徳大 院医歯薬 顎顔面矯正、³ 徳大 院医歯薬 口腔生命)

高齢者はインフルエンザなどのウイルス感染症に罹患した後、口腔や鼻咽腔に常在する細菌による細菌性肺炎を合併することが多い。また、糖尿病や慢性肺疾患などの加齢関連疾患は、肺炎重症化のリスク因子となる。我々はこれまでに、気道上皮の表層に誘導されるGP96が細菌性肺炎の増悪因子であることを証明した。しかし、感染肺組織におけるGP96の発現や炎症には空間的不均一性が認められ、肺炎病態の解明には感染局所における細胞間のミクロな相互作用の理解が重要であると考えた。本研究では、肺炎の重症化と病態形成につながる分子機構を空間トランスクリプトミクスにより検討した。

ヒト病理検体を用いた空間トランスクリプトーム解析において、GP96の強い発現と免疫細胞浸潤が認めら

れた領域では、炎症応答を促進させる経路に関わる遺伝子群の発現増加を認めた。一方で、細菌のクリアランスに重要なCXCL1とCXCL2の発現は著しく低下した。また、GP96の高発現領域では、炎症老化で注目される線維芽細胞の増殖とコラーゲンの産生を促す創傷治癒経路の活性化を認めた。さらに、プレオマイシン誘発性肺線維症マウスモデルに肺炎球菌を経鼻感染させたところ、コントロール群と比較して、細菌の下気道への伝播と定着、ならびに炎症細胞の浸潤にともなう組織傷害が亢進した。

以上の結果から、炎症老化にともなう気道組織の線維化が高齢者肺炎の重症化の一因である可能性が示唆された。

MP1-63 「変異型 *metK* を有する PAS 耐性結核菌の SAM 合成活性解析」

西谷 悠希^{1,2}、武部 克希³、土佐 郁恵²、中山 真彰²、有村 友紀¹、岡元 邦彰³、大原 直也²

(¹ 岡大 院医歯薬 口腔再建外科、² 岡大 院医歯薬 口腔微生物、³ 岡大 院医歯薬 歯科薬理)

【目的】 結核は日本において減少傾向であるが、世界的には脅威である。これまで、抗結核薬であるPAS人工耐性株をワクチン株BCGにて作製し、*S*-adenosylmethionine (SAM) 合成タンパクをコードする*metK*に点変異が生じていることを明らかにした。本研究では、点変異がMetKの活性にもたらす影響を検証することとした。

【材料と方法】 1) *metK*の変異によるSAM合成量の変化を、菌のライセートを用いて[³⁵S]Met標識にて測定した。2)

野生型および変異型*metK*でスメグマ菌を形質転換し、アフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換カラムを用いて菌体からMetK組換えタンパクを精製した。3) 同定された点変異とMetKの酵素活性との関連を分子動力学計算にて検証した。

【結果と考察】 ライセートを用いたSAM合成量の測定結果より、MetK変異株では野生株に比べてSAM合成量が減少し、MetKの活性の低下が示唆された。MetK変異株

で見られた点変異は、分子動力学計算より、ATP結合ポケットの開閉に影響を与えることで、ATP取り込み、およびSAMの解離への関与が示唆された。最後にスメグマ菌にて野生型および変異型MetK組換えタンパクを

単離・精製した。得られた組換えタンパクを用いて、HPLCにてSAMの合成量を測定し、MetKの比活性を算出し、変異と活性の直接的な関係を検証した。会員外共同研究者：飯島洋(日大 薬)

MP1-64 「肺炎球菌感染における High-Mobility Group Box 1 の解析」

滝澤 史雄^{1,2}、土門 久哲^{1,3}、平山 悟¹、前川 知樹^{1,2,3}、齋藤 瑠郁^{1,4}、
安井 惟人^{1,2}、遠藤 愛^{1,2}、寺尾 豊^{1,3}

(¹新潟大 院医歯 微生物、²新潟大 院医歯 歯周診断・再建、³新潟大 院医歯 高度口腔、⁴新潟大 院医歯 う蝕)

【背景】ダメージ関連分子パターン (DAMPs) は、細胞死や炎症性刺激に伴って細胞外へ放出される分子群であり、パターン認識受容体に結合し炎症反応などを誘導する。本研究では、肺炎球菌感染時に宿主細胞から漏出したDAMPsが、過剰な炎症反応を誘導するという仮説を立て検索を進めた。

【方法と結果】肺炎球菌感染マウスから気管支肺胞洗浄液を採取し、定量プロテオーム解析を行った。その結果、High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) を含む様々なDAMPsの増加が確認された。そこで、肺炎球菌感染マウスの肺組織切片を作製し、ハマトキシリンエオジン染色およびAlexa488標識によるHMGB1などのDAMPs免疫蛍光染色を行った。それらの結果、肺炎球菌感染マ

ウスでは非感染マウスと比較して、肺組織の損傷、損傷部位における多型核白血球の浸潤およびHMGB1の緑染が観察された。続いて、肺炎球菌の膜孔形成毒素ニューモリシン (Ply) をヒト好中球に添加して培養後、培養上清を採取し、Western blottingで解析した。その結果、非添加群と比較してPly添加群でHMGB1が検出された。次に、RAW264.7細胞に組換えHMGB1を添加培養し、培養上清中のTNF- α 濃度をELISAで測定した。その結果、HMGB1添加群では、非添加群と比較してTNF- α の濃度が有意に高かった。

【考察】HMGB1は、肺炎球菌Plyにより好中球の細胞外へ漏出し、周囲マクロファージのTNF- α 産生を増大させ、肺炎の重症化を引き起こすことが示唆された。

MP1-65 「緑膿菌の外膜透過性制御に関わる遺伝子の網羅的解析」

小林 零¹、邱 辰軒¹、永野 恵司¹

(¹北医療大 歯 微生物)

緑膿菌の高い自然耐性の一因として、低い外膜透過性が挙げられる。外膜透過性を亢進させることで、既存の抗菌薬の効果を増強させる可能性がある。本研究では、ランダム変異導入法を用いて、外膜透過性の制御に関わる遺伝子の網羅的探索を試みた。ラフィノース代謝関連遺伝子を導入した緑膿菌PA01株に、トランスポゾンを用いてランダム変異を誘発した。得られた変異株を、ラフィノース（三糖）を唯一の炭素源とする最小培地で連続培養し、増殖速度の速い変異株を選抜した。これらの変異株は、グルコース（単糖）を唯一の炭素源とする最小培地では、親株と増殖速度に差異はみられなかったが、ラフィノースおよびスタキ

オース（四糖）を含む培地では顕著な増殖促進を示した。さらに、変異株は、複数の抗菌薬に対する最小発育阻止濃度 (MIC) が親株の1/2 ~ 1/4に低下した。DNA配列解析により、解析した変異株はすべて、cyclic di-GMP受容体MorAをコードする*morA*遺伝子にトランスポゾンの挿入が確認された。これらの結果は、MorAが緑膿菌の外膜透過性の調節に関与することを示唆する。一方、ラフィノースなどの高分子物質の外膜透過性の制御に関わるOprFポーリンのタンパク質発現量に明確な変化はみられなかった。今後、OprFポーリンの構造変化を含む外膜透過性の亢進機序について、さらに研究を進める予定である。

MP1-66 「壊死性筋膜炎マウスモデルにおいて化膿レンサ球菌の感染が病態形成と腎障害に与える影響」

森 あり沙^{1,2}、広瀬 雄二郎¹、坂東 絢子¹、池田 恵莉¹、大野 誠之^{1,3}、川端 重忠^{1,4}
(¹ 阪大 院歯 口腔細菌、² 阪大 院歯 口外 2、³ 阪大 院歯 バイオインフォ、⁴ 阪大 CiDER)

壊死性筋膜炎を主たる病変とする劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、化膿レンサ球菌の感染によって引き起こされる致死率の高い疾患である。本研究では、マウス壊死性筋膜炎モデルを用い、化膿レンサ球菌が産生する主要な溶血毒素streptolysin S (SLS) およびstreptolysin O (SLO) が病態形成および腎障害に与える影響を検討した。

まず、化膿レンサ球菌5448株を親株 (WT) として、SLS欠失株 ($\Delta sagA$)、SLO欠失株 (Δslo)、およびSLS・SLO二重欠失株 ($\Delta sagA\Delta slo$) を作製した。各菌株を定常期まで培養し、PBSに再懸濁後、マウス後肢に筋

肉注射した。感染24時間後のマウス後肢には明らかな病変は認めなかったが、感染48時間後にはWT感染群および Δslo 感染群で $\Delta sagA\Delta slo$ 感染群と比較して重度な病変を認めた。血中IL-6、TNF α 、IL-1 β 、横紋筋融解の指標であるミオグロビンおよび腎障害の指標であるBUN濃度は、感染24時間後の時点で非感染群および $\Delta sagA\Delta slo$ 感染群に比べてWT感染群において有意に上昇していた。

以上の結果から、SLSおよびSLOは壊死性筋膜炎モデルにおいてサイトカインストーム、横紋筋融解、それに伴う腎障害に寄与している可能性が示唆された。

MP1-67 「病原真菌 *Candida albicans* のバイオフィルムに対する抗真菌薬と消毒薬の効果の検証」

浦崎 奈緒^{1,2}、永尾 潤一^{2,3}、岸川 咲吏^{2,3}、田中 芳彦^{2,3}
(¹ 福歯大 口腔歯学部 リサーチスチューデント、² 福歯大 機能生物 感染生物、³ 福歯大 口腔医学研究セ)

病原真菌*Candida albicans* (*C. albicans*) は、歯科補綴物などの医療器具にバイオフィルムを形成することで口腔カンジダ症の原因となる。超高齢社会がより深刻になっていく我が国において、口腔カンジダ症の患者数は近年増加しており、社会的関心は高い。口腔カンジダ症は高齢者や免疫不全患者などの生体防御能が著しく低下した易感染宿主において発症する。*C. albicans*のバイオフィルムは、酵母形と菌糸形で形成され、その周囲に多糖を主成分とする細胞外マトリックスが存在する。形成されたバイオフィルムは抗真菌薬

などに対して耐性を示すことが報告されており、治療が困難となるため問題とされている。本研究では、*in vitro*において*C. albicans*のバイオフィルム形成を評価する系を構築し、薬剤 (抗真菌および消毒薬) によるバイオフィルム形成阻害活性および形成されたバイオフィルムに対する抗バイオフィルム活性を評価することを目的とする。我々はこれまでに、いくつかの薬剤がバイオフィルム形成阻害活性あるいは抗バイオフィルム活性を示すことを明らかにしたので報告する。

MP1-68 「口腔 *Rothia* 属による硝酸塩・亜硝酸塩代謝に関する生化学的特性の検討」

柴田 怜^{1,2}、鷲尾 純平¹、江副 和子¹、金高 弘恭²、高橋 信博¹
(¹ 東北大 院歯 口腔生化、² 東北大 院歯 顎口腔矯正)

【目的】ヒト口腔マイクロバイーム (OMB) 構成細菌が緑黄色野菜や唾液に含まれる硝酸塩 (NO₃⁻) を抗菌や血管拡張効果を持つ亜硝酸塩 (NO₂⁻) へと代謝変換し、細菌性口腔疾患や循環器疾患の抑制に寄与することに注目が集まっている。我々は、OMB中のNO₃⁻代謝菌を網羅的に探索し、*Actinomyces*属、*Veillonella*属、

*Neisseria*属、*Rothia*属などが主なNO₂⁻産生菌であること、また、*Actinomyces*属や*Veillonella*属のNO₂⁻産生・分解活性が様々な口腔環境因子により影響されることを明らかにしてきたが、その影響は菌種により異なっていた。そこで、多様な代謝能を持ちながらもあまり研究されてこなかった*Rothia*属のNO₂⁻産生・分解活性に

ついて検討した。

【方法】*Rothia dentocariosa*の標準株を通法培地で好気培養し菌懸濁液を作成し、N03-またはN02-を加えた際のN02-産生および分解活性をGriess試薬にて評価した。さらに、諸環境因子（グルコース:Glu、乳酸:Lac、エタノール:Ethといった代謝基質、pH）による影響を解析した。

【結果・考察】Glu、Lac、Eth共存下でのN02-産生活性は、非共存下と比較し、それぞれ約3倍、6倍、1.6倍高かった。一方、pH 7とpH 5での活性はほぼ同じだった。一方、N02-分解活性は産生活性に比べ極めて低かった。以上の結果から、本菌がGlu、Lac、Ethという多様な基質の代謝と共役し、主にN02-産生菌として機能することが示唆された。

MP1-69 「口腔常在細菌 *Veillonella*、*Neisseria*、*Rothia* 属による赤色蛍光物質産生に関する生化学的検討」

志満 雅子^{1,2}、鷲尾 純平¹、江副 和子¹、田中 圭¹、金高 弘恭²、高橋 信博¹
(¹ 東北大 院歯 口腔生化、² 東北大 院歯 顎口腔矯正)

近年、口腔マイクロバイーム (OMB) や初期う蝕の易視覚化に、細菌が発する赤色蛍光 (RF) を利用するQLF法が用いられている。RFは細菌が産生するPorphyrin類に由来するとされているが、その代謝の詳細は不明である。予備実験にて、RF物質産生能を持つ細菌として*Veillonella*、*Neisseria*、*Rothia*属などの多種の常在菌を認めたことから、OMBのRF産生の有無は、必ずしも特定の細菌種によらない可能性が示された。そこで、細菌によるRF産生が、代謝環境中の基質により影響されるかを検討した。

実験には*V.atypica*、*N.mucosa*、*N.sicca*、*R.denticariosa*、*R.aeria*の標準株を用いた。各菌の懸濁液に0.05% 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を添加し、37℃でインキュベ

ト後のRFを410 nm励起光による蛍光スペクトラムで評価した。全菌種において630 nm付近のRFが検出され、RF責任物質はprotoporphyrin IXのようなporphyrin類と考えられた。5-ALAに代わりトリプトン (アミノ酸/ペプチド混合物) を添加すると、5-ALA添加時よりも低いものの同様のRFが検出され、そのRFはグルコースや乳酸の添加によって増加した。以上のことから、これらの細菌はアミノ酸とエネルギー基質から5-ALAを経由してRF責任物質であるporphyrin類を合成し、その合成は環境中の代謝基質により変化することが示され、RFが特定の細菌種によらず口腔内栄養環境によって変化することが示唆された。

MP1-70 「口腔細菌がマウスガード材料エチレンビニルアセテートの変色に及ぼす影響」

大石 明広¹、内記 良一¹、廣畑 誠人¹、西川 清¹、朝倉 正紀^{2,3}、林 裕基³、林 達秀²、近藤 尚知³、長谷川 義明¹
(¹ 愛院大 歯 微生物、² 愛院大 歯 理工、³ 愛院大 歯 冠橋義歯・インプラント)

【目的】歯や顎関節を保護するマウスガード (MG) は、様々な口腔細菌に曝露されることで汚染や変色が懸念される。本研究ではMGに広く使用されているエチレンビニルアセテート (EVA) の変色に及ぼす種々の口腔細菌の影響を検討した。

【方法】2種のグラム陰性嫌気性桿菌*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) 及び*Fusobacterium nucleatum*、3種のグラム陽性通性嫌気性球菌*Streptococcus mutans*、*Streptococcus oralis* 及び*Staphylococcus aureus*を用いた。加熱吸引がEVAの変色に与える影響を評価するため、石膏模型への加熱吸引の有無で比較した。EVAを各菌の培養液に1または2週間浸漬した。変色は色差計によるL*a*b*値の測定から

色差 (ΔE) で評価した。

【結果】*P.g.*との浸漬では1・2週間いずれにおいても ΔE は他菌に比べ有意に高く顕著な色調変化が認められた。また、*P.g.*の1週間の浸漬では加熱吸引の有無で差は認められなかったが、2週間では加熱吸引あり群が有意に高かった。

【考察】EVAの変色は*P.g.*に特異的に引き起こされることが、加熱吸引による加工は長期的にその影響を受けやすくなる可能性が示唆された。今後はEVA変色に関与する*P.g.*の代謝産物の同定を進め、より衛生的なMG使用に向けた基礎的知見の蓄積を目指す。

日時：9月5日（金）12:50～18:30

会場：ポスター会場（会議場1階 イベントホール）

モリタ優秀発表賞審査「再生・臨床」（MP1-71～78）

MP1-71 「ヒト骨組織を用いた骨細胞の網羅的遺伝子発現解析－皮質骨再生に向けた分子基盤の探索－」

西澤 千晶^{1,2}、高垣 裕子³、道上 敏美¹、宮川 和晃^{1,2}（¹大阪母子 骨発育、²阪大 院歯 口外1、³神歯大 院歯）

【目的】骨は外側の皮質骨と内部の海綿骨から構成される。術後の長期安定性を得るには再生骨と周囲骨組織との一体化、特に皮質骨の連続性獲得が重要である。そこで本研究では、骨恒常性維持の要である骨細胞に着目し、皮質骨および海綿骨に含まれる骨細胞の機能的差異を解析することで、皮質骨を任意に再生できる技術開発の端緒となる分子基盤の解明を目的とした。

【材料・方法】学内倫理審査委員会の承認下、患者・代諾者の同意を得て骨移植術の際に残余検体となったドナー腸骨（女兒、平均6.5歳、n=6）を解析に使用した。前腸骨稜下の二次海綿骨および皮質骨から5回のコラゲナーゼ処理によって骨髓や骨芽細胞を除去し、各骨片中に残った骨細胞のbulk RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を行い、皮質骨骨細胞と海綿骨骨細胞を比

較した。

【結果】全発現変動遺伝子（1393遺伝子）を対象としたIPA pathway解析では、皮質骨骨細胞にて活性化するpathwayは57個、海綿骨骨細胞で活性化するpathwayは2個だった。海綿骨骨細胞に比べ、皮質骨骨細胞で2倍以上高発現する遺伝子（439遺伝子）を対象としたEnrichment解析では、細胞外基質の形成、石灰化、骨格成長、軸索ガイダンスに関連する生物学的Termが顕在化された。

【考察】皮質骨と海綿骨に含まれる骨細胞の遺伝子発現プロファイルは明確に異なった。今後、骨細胞の機能的多様性に関する研究が新規骨再生治療に寄与する可能性が示唆された。

MP1-72 「歯小囊細胞からセメント芽細胞への分化における Hertwig 上皮鞘基底膜成分の役割」

新藤 美湖^{1,2}、池崎 晶二郎²、大津 圭史²、加倉 加恵¹、原田 英光²（¹福歯大 インプラント、²岩医大 歯 発生生物）

歯根の成長過程で歯根象牙質の歯根膜側では歯小囊細胞が遊走してセメント芽細胞に分化し、セメント質を形成する。しかし、歯小囊細胞が象牙質表面でセメント芽細胞に分化するメカニズムは不明である。電子顕微鏡による観察からHertwig上皮鞘（HERS）が歯根象牙質表面に形成した基底膜構造が存在し、この構造がセメント芽細胞への分化誘導に深く関わると考えた。Hertwig上皮鞘細胞株（HERS02T）が分泌する基底膜成分の中で検出量の多かったlaminin332、tenascin、periostinの複合体について機能解析を行った。まず、これらのタンパクが歯根発生中の歯根象牙質表面に存在することを免疫組織学的に明らかにした。これらのタンパクをアパタイトの培養プレートにコート

して歯小囊細胞株（MDF）の接着性について検討した結果、非コートプレートでは培養2日目にはすべての細胞が凝集して剥がれて、細胞分化や石灰化は観察されなかった。一方、コートした培養プレートでは時間経過とともに高いALP活性とコラーゲン、Runx2、Osterixの遺伝子発現の上昇を認めた。さらにセメント芽細胞マーカーであるSparcl1（SPARC-like1）とbone sialoprotein（Ibsp）のタンパク発現ならびに遺伝子発現の上昇を認めた。以上のことから歯小囊細胞はHertwig上皮鞘が分泌した基底膜タンパクを介して象牙質表面に接着することがセメント芽細胞への分化誘導の起点となることが示唆された。

MP1-73 「イモリ下顎切除後の細胞分化と再生機序の解明」

坪崎 健斗¹、田谷 雄二^{1,2}、埴 太宥¹、工藤 朝雄¹、佐藤 かおり¹、添野 雄一¹
 (1 日歯大 生命歯 病理、2 日歯大 生命歯 初年次教育)

【目的】本研究ではヒト顎骨再生の実現のため、高度な再生能力をもつ両生類イモリを使って下顎切除後の再生機序の解明を目指した。

【材料と方法】アカハライモリの下顎前方1/2を切除し、64週にわたり下顎再生過程を解析した。

【結果】切除後2週までに断端組織は再生上皮で被覆、4週後には上皮下に再生芽を形成し、骨芽細胞などの細胞分化がみられた。骨・軟骨では、4週後にメッケル軟骨が再生し、8週後になると軟骨にガイドされて膜性骨化によって歯槽骨が再生し始め、歯槽骨再生部では歯胚発生と歯質形成が生じ始めた。16週後には再生軟骨が細くなりつつ正中まで達し、歯槽骨も伸長するとともに下顎骨体部の再生を始めた。32週後には下顎骨底部ができ、64週後には切除前の状態にほぼ回復

した。qPCR解析では、再生芽マーカ*kazald1*、軟骨細胞の分化マーカ*sox9*、骨芽細胞の分化マーカ*runx2*、エナメル質形成マーカ*amelogenin*の発現について、組織所見と一致した結果が得られた。

【結論】切除された下顎組織は顎骨や歯牙を含めて64週余りでほぼ復元した。イモリでは早期な再生上皮の被覆後、肉芽形成を伴わずに再生芽からの細胞分化と組織再生を生じた。メッケル軟骨が骨再生と伸長をガイドすること、膜性骨化により骨再生することなどが明らかとなった。

【会員外共同研究者】同大学 藤田和也、川本沙也華、慶応義塾大学 貴志和生・石井龍之、筑波大学 千葉親文。

MP1-74 「口腔組織由来間葉系幹細胞の抜歯窩治癒過程における細胞動態と骨分化制御機構の解明」

宮田 春香¹

(1 鹿大 院医歯 顎顔面補綴)

【目的】口腔内には様々な歯周組織由来の間葉系幹細胞(MSC)が存在し、分子特性によって局在する組織が異なることが報告されている。しかし分子発現の異なるMSCを生体内で同時に評価した報告は少なく、また各MSCが骨形成においてどのような機能を担っているか解明されていない。本研究では抜歯窩治癒過程における各MSCの局在や遺伝子発現を評価し、それぞれの機能解明につなげることを目的とする。

【材料と方法】10週齢オスC57BL/6Jマウスで下顎第2臼歯抜歯モデルを作成し、抜歯後1、3、5、7日目に下顎骨を採取し組織切片を作成した。作成した組織切片をH&E染色および、各MSCマーカーで免疫染色を行った。同タイムラインで下顎骨を回収し、RNAの抽出およびcDNAに逆転写後、RT-PCRにて各遺伝子発現評価を

行った。

【結果】生理的条件下では骨髓組織にLepR+/Axin2LowMSCおよびAxin2HighMSCを認めた。これら分子発現の異なるMSCは治癒過程において異なる局在を示した。RT-PCRでは抜歯1日後にMSCマーカーの遺伝子発現は減少傾向を認め、一方で骨分化マーカーであるRunx2は増加傾向を認めた。また、Axin2の発現をRunx2と依存して制御すると報告されているHdac3の発現も増加する傾向を認めた。

【考察】本研究でAxin2陽性MSCが顎骨骨髓組織にも存在することを示した。生理的条件下および抜歯窩の治癒過程において各MSCが異なる局在を示すことから、骨再生においても異なる役割を担っていることが示唆された。

MP1-75 「細胞増殖活性に基づく歯根膜幹細胞の細胞動態解析」

小野 喜樹^{1,2,3}、土橋 梓¹、小林 水輝¹、Pwint Phyu Hlaing¹、加来 賢¹(1)新潟大 院医歯 生体補綴、²新潟大 院医歯 オミックス組織再生、³新潟大 研究統括)

【目的】歯根膜は歯と歯槽骨を結合し、口腔機能において重要な組織である。しかし、歯根膜幹細胞(PDLSC)の局在ならびに増殖分化動態は十分に解明されていない。そこで本研究では、組織幹細胞の特徴である組織中での増殖活性に着目し、これをLabel-retaining cell(LRC)として検出するとともに、誘導性の多色蛍光ラベリングを用いて、発生、リモデリング、再生過程における細胞増殖活性の変化を解析することを目的とした。

【方法と結果】LRCの検出には、生後15日齢のマウスに5-ethynyl-2'-deoxyuridine(EdU)を投与し、12週間にわたり標識細胞を追跡した。投与直後では歯根膜全域にEdU陽性細胞が検出されたが、12週間後には陽性細胞数は減少し、セメント質近傍に局在していた。

また、LRCは高頻度で幹細胞マーカーを発現していた。次に、RGBow: UBC-CreERT2マウスを用いて、薬剤誘導性に多色蛍光標識を行い、単一細胞に由来する細胞クラスターを追跡した。リモデリング過程における最長1年間の追跡では、細胞クラスターの成長速度は緩やかであるものの、歯根膜全域で多細胞クラスターが確認された。一方、発生期および再生(即時再植)過程では、細胞クラスターの細胞数が顕著に増加し、特にセメント質表面で明瞭な多細胞クラスターが検出された。

【結論】従来、PDLSCが好局在するとされてきた骨近傍の血管周囲だけではなく、セメント質近傍にもPDLSCが存在することが示唆された。

MP1-76 「BMP-2 誘導骨による免疫・造血機能の再構築」

土佐 郁恵¹、大原 直也¹、窪木 拓男²(1)岡大 院医歯薬 口腔微生物、²岡大 院医歯薬 インプラント再生補綴)

【目的】BMP-2は再生医療への応用が進んでおり、本邦でも顎骨再生を目的とした治験が開始されている。再生骨には力学的支持に加え、免疫機能の担保も求められる。血球細胞は骨髄で産生され、そのニッチはCAR(Cxcl12-abundant reticular)細胞が構築する。本研究では、BMP-2により形成された骨(BMP-2誘導骨)が、機能的な骨髄ニッチを持つかを検討した。

【材料および方法】Cxcl12-GFPマウスおよび野生型マウスにrhBMP-2/ β -TCP複合体を皮下移植し、4週後に形成された骨を回収した。組織学的解析、フローサイトメトリー、scRNA-seqにより長管骨骨髄と比較した。放射線照射マウスに対してBMP-2誘導骨由来細胞または骨髄細胞を静脈投与し、造血再構築とニッチ機能を評価した。

【結果】BMP-2誘導骨は骨髄に類似した構造を持ち、造血幹細胞、CAR細胞、血球系細胞を含んでいた。scRNA-seqでは、細胞群の遺伝子発現が長管骨骨髄と高い類似性を示した。BMP-2誘導骨由来細胞の移植により、放射線照射マウスの生存率は0%から100%に回復し、末梢血および骨髄細胞の大半がドナー由来GFP陽性細胞で置換された。照射を受けたBMP-2誘導骨内にも、CD45.1陽性造血幹細胞の生着が確認された。主要な免疫細胞もドナー由来として再構築されており、BMP-2誘導骨の免疫造血機能が示唆された。

【結論】BMP-2は造血ニッチを備えた機能的な骨髄組織を異所的に誘導する。

会員外共同研究者：大野充昭(岡大 院医歯薬)

MP1-77 「上皮封鎖性向上を目的とした Ce-TZP/Al₂O₃ インプラントの表面性状の最適化」山森 庄馬¹、浦野 絵里¹、望月 文子²、岩佐 文則³(¹ 昭医大 歯 補綴、² 昭医大 歯 口腔生理、³ 明海大 歯 冠橋義歯補綴)

【目的】インプラントの長期的な成功には十分な周囲軟組織封鎖性の獲得が重要だが、チタン(Ti)代替材料として注目されるCe-TZP/Al₂O₃(Zr)の上皮付着を促進する最適な表面性状は未解明である。そこで本研究では、マウス歯肉接合上皮細胞(JE-1)を用いてCe-TZP/Al₂O₃の表面性状が歯肉上皮細胞接着に及ぼす影響を検討した。

【方法】TiおよびZr基盤に機械研磨(M)または鏡面研磨(Mr)を施し、各基盤の表面性状はSEM、AFM、およびRa値により評価した。各基盤上でJE-1を培養し、MTS法にて細胞増殖を評価した。また、接着性タンパク質(Laminin-5、Integrinβ4、Cadherin-1)の発現を免疫組織化学染色(IHC)と定量リアルタイムPCR(qPCR)で解析した。さらに、振動刺激による細胞接着試験により

基盤と細胞との接着強さを測定した。

【結果】Ra値は、MTiおよびMZrで約0.9μm、MrTiおよびMrZrで約0.02μmであった。いずれの基盤上のJE-1の増殖は培養時間とともに増加し、7日目にはMTiよりもMrTiで、MZrよりもMrZrで有意に増殖が亢進した。IHCでは各基盤上のJE-1にLaminin-5、Integrinβ4、Cadherin-1の発現を認め、qPCRでは、MZrと比較してMrZrでLaminin-5とIntegrinβ4の発現量が高い傾向を示した。さらに、細胞接着試験において、MZrと比べてMrZrとJE-1との接着強さが有意に強かった。

【結論】Ce-TZP/Al₂O₃において、鏡面研磨は歯肉上皮細胞の接着性を高める有効な表面処理である可能性が示唆された。

MP1-78 「接合上皮細胞の修復材料への再付着に関する ODAM の効果」

高満 正宜¹、大津 圭史²、池崎 晶二郎²、野田 守¹、原田 英光²(¹ 岩医大 歯 う蝕、² 岩医大 歯 発生生物)

【背景】接合上皮はエナメル質と接着することで歯周組織への異物の侵入を防ぐ役割を担っているが、歯頸部齲蝕の場合、修復材料によっては接合上皮の接着性の低下が生じる。そこで材料への上皮細胞接着性を向上させるために接合上皮分泌タンパクであるODAM(odontogenic, ameloblast associated protein)が有用であるかを検討した。

【方法】ハイドロキシアパタイトディスク(Hp)上に窩洞を形成し、コンポジットレジン(CR)を充填した培養プレートを作製した。そのプレートのODAMコート群と非コート群で接合上皮細胞株(mHAT-JE01)の初期接着、接着時の細胞の形態、細胞増殖能、アクチンフィラメ

ントの形成等について検討した。また走査電子顕微鏡(SEM)撮影にて細胞形態の違いや細胞突起の形態や数を調べた。

【結果】ODAMコート群は非コート群に比べて極めて高い初期接着能、増殖能、細胞の伸展に伴ったアクチン形成能を示した。SEM解析からもODAMコートしたCRの方が、より細胞の伸展性や突起形成を顕著に認めた。

【考察】以上の結果から、ODAMコートはレジン充填による接合上皮接着能・増殖能の低下を回復させる可能性が示された。ODAMで表面コートすることは、コンポジットレジン修復による治療ケースでも歯周病予防効果が期待できると思われる。

日時：9月5日（金）12:50～18:30

会場：ポスター会場（会議場1階 イベントホール）

モリタ優秀発表賞審査「留学生」（MP1-79～95）

MP1-79 「PRIP deficiency promotes YAP nuclear translocation enhancing tissue fibrosis」

袁 美群¹、佐野 朋美¹、溝上 顕子²、高 靖³、兼松 隆¹

（¹九大 院歯 口腔機能分子、²九大 院歯 OBT 研究セ、³九大 院歯 口腔細胞工学）

Fibrosis is characterized by excessive accumulation of extracellular matrix components. Accumulating evidence has highlighted the critical role of YAP/TAZ in the regulation of fibrogenesis. Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) is widely expressed in organs and is involved in numerous cellular processes. PRIP has been shown to inhibit PI3K/AKT signaling, a downstream pathway of TGF- β signaling. Here, we investigated the function and mechanism of PRIP in fibrosis. Wild-type (WT) and Prip-knockout (KO) mice were treated with angiotensin II to induce tissue fibrosis. Prip-KO mice showed significantly

increased collagen deposition in the kidney and heart compared to WT mice. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from WT and Prip-KO mice were treated with TGF- β 1 and showed that PRIP deficiency upregulated the expression of fibrosis markers. In addition, cell migration was accelerated in Prip-KO MEFs. PRIP deficiency-promoted PI3K/AKT activation facilitated the phosphorylation of MST2 at threonine 117 compared to that in WT MEFs. Subsequently, p-MST2 (Thr117) decreased YAP phosphorylation and increased YAP nuclear translocation, leading to tissue fibrosis.

MP1-80 「Neutrophil elastase release in the trigeminal ganglion induced by trigeminal nerve root compression contributes to orofacial pain hypersensitivity」

Yue Zhou¹、Hitomi Suzuro¹、Koichi Iwata¹、Masamichi Shinoda¹

（¹Nihon Univ Sch Dent, Dept Physiol）

Trigeminal neuralgia is primarily caused by vascular compression of the trigeminal root. However, the pain mechanism remains unclear. This study aims to elucidate the role of neutrophils in the trigeminal ganglion (TG) in the pathogenesis of trigeminal neuralgia. A glass rod was inserted through the rat skull to compress the left trigeminal nerve root (TNC group). No compression was applied in the sham group. On day 7 after TNC, mechanical head-withdrawal threshold (MHWT) decreased compared with sham group. The number of TG neurons immunoreactive (IR) for the neuronal damage marker ATF3 and

the amount of neutrophil elastase (ELA2) in the TG were both increased in the TNC group. The ELA2 receptor PAR2 was expressed in TG neuron. The number of ELA2-IR neutrophils was also increased in the trigeminal nerve root. ELA2 or PAR2 inhibition in the TG, as well as systemic administration of carbamazepine, a medication for trigeminal neuralgia, attenuated the TNC-induced decrease in MHWT. These results suggest that TNC-induced neuronal damage and accumulation of ELA2-producing neutrophils in the TG probably activates PAR2-expressed TG neurons, contributing to orofacial pain hypersensitivity.

MP1-81 「Testosterone-mediated downregulation of fatty acid synthesis suppresses microglial inflammation in a sex-specific mechanism」

Haolin Zheng¹、溝上 顕子²、佐野 朋美¹、山脇 洋輔³、自見 英治郎^{2,4}、兼松 隆¹
(¹ 九大 院歯 口腔機能分子、² 九大 院歯 口腔脳機能病態、³ 第一薬科大 先端薬理、⁴ 九大 院歯 口腔細胞工学)

Emerging evidence suggests that chronic inflammatory conditions such as obesity and periodontitis may exacerbate Alzheimer's disease (AD) through systemic inflammation, highlighting the importance of inflammatory immune signaling pathways. AD has marked sex differences, with women having a higher prevalence and severity of the disease. This study investigated the role of testosterone in regulating sex-specific microglial inflammation via miRNA-mediated pathways. Hippocampal microglia male and female mice revealed significant sex differences in miRNA expression via microarray analysis, with

males showing greater changes, particularly in miRNAs targeting fatty acid synthesis. MG6 microglial cells showed that testosterone upregulates male-enriched miRNAs and suppresses the expression of fatty acid synthase (FASN). This testosterone-induced FASN downregulation attenuated NF- κ B/p65 phosphorylation and reduced TNF- α secretion after LPS-induced inflammation. These findings reveal the anti-inflammatory role of testosterone in male microglia via the miRNA-FASN-NF- κ B axis, which may attenuate AD susceptibility. The study provides insight into AD pathogenesis and therapeutic strategies.

MP1-82 「メカニカルストレスが歯肉上皮細胞の pro-IL-1 β 発現におよぼす影響」

Chengwei Li¹、井上 博¹、寒川 延子¹、合田 征司¹
(¹ 大歯大 生理)

【目的】ブラキシズムは歯ぎしりや食いしばりによる過度なメカニカルストレス (MS) で歯や顎、歯周組織に影響を及ぼし、歯の動揺や歯肉退縮、さらには心血管系など全身への影響も報告されている。歯槽骨や歯根膜への影響は多く研究されているが、同様の力が歯肉上皮細胞に与える影響は不明である。本研究ではヒト歯肉上皮細胞株Ca9-22を用い、MSがpro-IL-1 β 発現に与える影響とそのシグナル伝達経路について検討した。

【方法】Ca9-22細胞をType IVコラーゲンでコートしたシリコンチャンバーに播種し、10%FBS存在下で培養した。80~90%の密度に達した後、5Hz・20%伸展率で、10分伸展・10分休止を1サイクルとし、計5サイクル伸展刺激を加えた群を実験群、伸展を行わず静置した細

胞を対照群とした。刺激終了後、37℃で20分間静置しサンプルを回収した。Pro-IL-1 β 発現および関連タンパク質のリン酸化をウェスタンブロッティング法で解析した。

【結果】(1) MSによりpro-IL-1 β 発現が上昇した。(2) MSによりFAK, p130Cas, ERK 1/2のリン酸化が誘導された。(3) MSにより自然免疫応答を誘導する細胞内受容体NOD2の発現が上昇した。

【考察】ヒト歯肉上皮細胞Ca9-22におけるMSによるpro-IL-1 β 発現とNOD2発現上昇にはFAK, p130Cas, ERK 1/2のリン酸化が関与している可能性が示唆された。

【利益相反】本研究において開示すべき利益相反関係にある企業はない。

MP1-83 「Effects of metabolites of indigenous oral bacteria *Veillonella* species on the proliferation of normal and oral squamous cell carcinoma cells」

Wenhui Xu¹、Jumpei Washio¹、Satoko Sato¹、Kazuko Ezoe¹、Yuki Abiko¹、
Nobuhiro Takahashi¹

(¹東北大 院歯 口腔生化)

Introduction: The effects of metabolites of major periodontopathic bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis*, on host cells have been well investigated, but the effects of others are unclear. Therefore, we investigated the effects of *Veillonella* species-indigenous bacteria commonly less associated with the pathogenicity of oral diseases-on host cells.

Methods: *V. atypica* (Va) was cultured anaerobically, and the culture supernatant was obtained. HaCaT (normal cell) and HSC2 (cancer cell) were cultured with the filtered supernatant of Va, and the effect on their proliferation was evaluated. Similarly, the effect of propionate,

the most abundant metabolite detected in the supernatant, was evaluated.

Results and Conclusion: Va supernatant inhibited the proliferation of both cells, and the inhibition rate was higher in HSC2 than in HaCaT cells. Propionate similarly inhibited both cells, suggesting that it may be one of the responsible substances for the inhibition. In further, the effect on HSC2 was observed in earlier days (≤ 1 days) and under lower concentrations (≤ 2.5 mM) compared to HaCaT, suggesting that propionate at a certain concentration may selectively inhibit cancer cells.

MP1-84 「Growth Inhibitory Effect of 5-Aminolevulinic Acid on Cariogenic Bacteria」

Peipei Luo¹、Takayuki Nambu²、Hiroki Takigawa²、Hugo Maruyama²、
Chiho Mashimo²、Toshinori Okinaga²、Kazuya Takahashi¹

(¹Osaka Dent Univ, Dept Geriatric Dent、²Osaka Dent Univ, Dept Microbiol)

5-Aminolevulinic acid (5-ALA), one of the amino acids, is metabolized within bacterial cells, leading to intracellular accumulation of porphyrins. When these porphyrins are irradiated with specific wavelengths of light, they generate reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen, which exert cytotoxic effects against bacteria. This mechanism is being actively investigated for its clinical applications in photodynamic therapy (PDT). In our studies focusing on PDT targeting cariogenic bacteria, specifically *Streptococcus mutans*

and *Streptococcus sobrinus*, we discovered that the simple addition of 5-ALA phosphate to the culture medium inhibits bacterial growth even in the absence of light irradiation. Furthermore, this growth inhibitory effect was observed exclusively under aerobic conditions, suggesting that oxidative stress or metabolic disruptions triggered by oxygen presence may be involved. Currently, we are conducting detailed investigations into this novel antimicrobial mechanism of 5-ALA, which does not depend on photoactivation.

MP1-85 「Osteogenesis imperfecta-specific stem cells exhibit cell cycle dysfunction via p21」

Arwa Mohamed Aboelmaged¹、Yukari Kyumoto-Nakamura¹、M Majed Sharifa¹、
Litong Yu¹、Lisha Dai¹、Ying Liu¹、Mhd Fouad Zakaria¹、Soichiro Sonoda¹、
Hiroki Kato¹、Takayoshi Yamaza¹

(¹Kyushu Univ Fac Dent Sci, Sect Mol Cell Biol Oral Anat)

Background: Osteogenesis imperfecta (OI) disrupts extracellular matrix integrity via defective type I collagen, impairing skeletal growth.

While growth plate (GP) failure in long bones is established, the role of stem cells/progenitor cells in the GP remains unclear in OI pathology.

This research aims to identify the cell cycle regulation of OI-specific stem cells (OI-SCs).

Methods:We analyzed the cell cycle condition, its related molecules, and their proteolytic status in our established OI-SCs by flow cytometry, western blotting, and immunofluorescence.

Results:OI-SCs exhibited delayed G1/S transition associated with nuclear accumulation of p21. The

p21 degradation was impaired due to proteasomal dysfunction in OI-SCs.

Conclusion:Aberrant p21 stabilization via defective proteasomal degradation contributes to the cell cycle dysregulation in OI-SCs. This dysregulation may underlie OI pathology and represents a target for therapeutic intervention.

MP1-86 「BMP9による解糖系活性化と乳酸シグナルを介した骨分化制御機構」

成 昌典¹、楠山 譲二¹

(¹ 科学大 生体情報継承)

Bone morphogenic protein 9 (BMP9)は、BMP2やBMP4を凌駕する強力な骨誘導能を有することが報告されてきたが、BMP9による骨分化能の特異性を説明づける分子機構は十分に解明されていない。我々は、骨芽細胞が骨基質を形成する成熟骨芽細胞へと分化する過程において、糖代謝による大量のエネルギー産生が不可欠である点に着目した。そこでマウス骨芽細胞株MC3T3E1、ヒト骨芽細胞株MG63にBMP2、BMP4、BMP9による分化を誘導し、エネルギー代謝の細胞外フラックス解析、細胞内代謝物のメタボローム解析、RNA-seq解析を行ったところ、BMP9はBMP2やBMP4に比べて解糖系の活性化が顕著であり、ATPと乳酸の産生量が著しく増加していることが分かった。BMP9はKLF4、NFATC2

等による特徴的な複数の転写因子の発現誘導を介し、解糖系初期に関与するHexokinase 2 (HK2)の発現レベルを上昇させ、解糖系のドライバーとして機能させていた。さらに、BMP9による乳酸産生の増加は、乳酸によって安定化されるシグナル伝達因子であるNDRG3と、ヒストン修飾の一種であるヒストンラクチル化を顕著に上昇させており、それぞれがBMP9誘導性の骨分化関連遺伝子の発現上昇に寄与していた。このようにBMP9は基盤的なATP産生、乳酸を介して活性化されるNDRG3シグナル、ヒストンラクチル化という骨分化促進を担う3つ組を同時に活性化することで、強力な骨分化能を発揮していると考えられる。

MP1-87 「魚鱗ゼラチンの粘稠度が左右する骨形成特性の差異 —骨幅と緻密骨様骨量の視点から—」

陳 徳容¹、青木 和広²

(¹ 科学大・院医歯 セラミックバイオ、² 科学大・院医歯 口腔基礎工)

【目的】骨の局所再建において、成長因子などのシグナル分子をその場に保持する足場材料の開発は重要な課題である。我々は、骨形成促進因子を注射により標的部位に投与して骨幅を増加させる新たな治療法を開発を進めているが、足場材料の粘稠度が新生骨の形成様式に与える影響は十分に検証されていない。本研究では、粘稠度の異なる足場材料が骨伝導能に及ぼす効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】魚鱗由来ゼラチンを0.1、0.3、0.5 mg/mlの3濃度で調製し、粘稠度を測定した。各ゼラチンにBMP-2 (0.3 μg) とRANKL結合ペプチド (0.66 mg) を含浸させ、8週齢C57BL/6Jマウスの上顎切歯と第一大臼歯間に注入した。4週後にμCT像を取得し、ImageJで新生骨の幅と骨量を定量評価した。また、新生骨と母

骨の境界は、蛍光ラベルによるラベリング像で確認し、von Kossa染色で石灰化骨量を測定した。統計解析はShapiro-Wilk検定で正規性を確認後、ANOVAとTukey検定を用いた。

【成績】せん断速度3/sにおける粘稠度は約20、400、2000 mPa・sであった。新生骨幅は低粘稠度群で0.23 ± 0.11 mm、高粘稠度群で0.06 ± 0.02 mmとなり、有意に増加した (+283%、p<0.05)。緻密骨様骨量は低粘稠度群33.29 ± 1.90%、高粘稠度群66.79 ± 2.34%で、有意に減少した (-50%、p<0.05)。

【結論】低粘稠度の足場材料は骨幅の拡大に寄与し、高粘稠度の材料は緻密骨様骨の形成を促進する可能性が示唆された。

MP1-88 「CCN3 Knockout Reduces Osteoarthritis Severity in Mice by Preserving Cartilage Matrix Components」

Janvier Habumugisha^{1,2}、Hiroshi Kamioka²、Satoshi Kubota¹、Takako Hattori¹

(¹Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, Dept Biochem Mol Dent、²Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, Dept Orthodont)

Osteoarthritis (OA) is a common degenerative joint disease characterized by cartilage degradation, synovial inflammation, and subchondral bone remodeling. Our previous studies showed that CCN3 expression increases with age in knee cartilage, and cartilage-specific overexpression of CCN3 induces senescence-associated secretory phenotype (SASP) and OA-like changes. Here, we examined the effects of CCN3 deletion on OA development in a murine model of destabilization of the medial meniscus (DMM). Histological analysis revealed that CCN3 knockout (KO) mice exhibited reduced cartilage

degradation and proteoglycan loss. Gene and protein analyses demonstrated that CCN3 knock out suppressed matrix-degrading enzymes production (MMP-13, ADAMTS-5) and attenuated cartilage degradation. Immunofluorescence showed increased Ki-67 expression in KO OA cartilage, indicating enhanced chondrocyte proliferation. In wild-type OA samples, colocalization of CCN3 and CD44 suggested a possible interaction affecting chondrocyte function. These findings suggest that CCN3 contributes to OA progression, making it a potential therapeutic target.

MP1-89 「Identification and characterization of a novel bone resorption modulator in c-Src/p130Cas axis」

李 傲男¹、Jing Gao¹、自見 英治郎^{1,2}

(¹九大 院歯 口腔細胞工学、²九大 院歯 OBT 研究セ)

Podosome formation is essential for osteoclastic bone resorption, serving as the structural basis for the sealing zone that enables bone resorption. Mice lacking conventional c-src or its adaptor p130Cas specifically in osteoclasts exhibit osteopetrosis caused by impaired osteoclastic bone resorption due to defective podosome formation. We previously showed that c-Src and p130Cas form a complex with Pyk2. To identify novel effectors of this complex, we performed anti-Pyk2 immunoprecipitation followed by mass spectrometry using osteoclasts from WT, c-srcKO, and p130CasΔOCL^{-/-} mice. Through a

series of immunoprecipitation experiments, we narrowed down the candidates to 18 proteins, we focused on molecule X, which plays a critical role in actin cytoskeleton remodeling. Knockdown of X in RAW264.7 or bone marrow-derived cells resulted in reduced actin ring formation, impaired multinucleation, and diminished bone resorptive activity. Immunofluorescence analysis revealed that X colocalizes with p130Cas at the actin ring, and co-immunoprecipitation demonstrated that X is a downstream effector of c-Src/p130Cas signaling, regulating actin ring formation and osteoclastic bone resorption.

MP1-90 「Elucidation of the physiological role of p130Cas in palatogenesis」

Tao Han¹、Jing Gao¹、Wei Wu¹、Eijiro Jimi^{1,2}

(¹Kyushu Univ Fac Dent Sci, Lab Mol Cell Biochem、²Kyushu Univ Fac Dent Sci, OBT Res Cent)

Palatogenesis is a complicated and intricate process involving multiple morphogenetic events, and its disruption can result in cleft palate,

a common congenital anomaly. In this study, we investigated the role of p130Crk-associated substrate (p130Cas), an adaptor protein involved

in integrin and cytokine signaling, during palate development. Analysis of published RNA-Seq dataset confirmed that p130Cas expressed in palatal shelves. Using tamoxifen-inducible p130Cas-deficient mice (p130Cas^{flox/flox} x CAG-Cre/ERTM), we found that p130Cas-deficient embryos exhibit cleft palate between embryonic day (E) 16.5 and E18.5, with palatal shelf growth arrested in the horizontal direction. Histological analysis revealed delayed

elevation of the palatal shelves at E14.5, and immunostaining for Ki-67 showed reduced cell proliferation at the same stage. Furthermore, bulk RNA sequencing demonstrated significant downregulation of genes associated with key developmental pathways. These findings indicate that p130Cas is essential for promoting cell proliferation and regulating the proper elevation and fusion of the palatal shelves during palatogenesis.

MP1-91 「Novel expression and role of IRR in dental pulp stem cells」

Ying Liu¹, Yukari Kyumoto-Namakura¹, M. Majd Sharifa¹, Liting Yu¹,
Arwa Mohamed Aboelmaged¹, Lisha Dai¹, Mhd Fouad Zakaria¹, Soichiro Sonoda¹,
Hiroki Kato¹, Takayoshi Yamaza¹
(¹Kyushu Univ Fac Dent Sci, Sect Mol Cell Biol Oral Anat)

Object: Dental pulp stem cells (DPSCs) possess the odontoblast differentiation capacity, responsible for dentin formation. Insulin receptor-related receptor (IRR) is known as an alkaline pH sensor, assuming the association with dentin mineralization. Here, we aim to verify the expression of IRR in rat DPSCs and explore its potential role in odontoblast differentiation.

Methods: We isolated DPSCs from dental pulp tissues of rat incisors and cultured them under temporal and periodic alkaline stimulation (pH 7.4 and pH 8.4). We then analyzed IRR expression and assessed odontoblast differentiation.

Results: Rat DPSCs expressed the IRR gene and protein. The temporal and periodic pH 8.4 stimulation could increase the alkaline phosphatase (ALP) activity and induce mineralized matrix deposition by ALP and Alizarin Red S staining. The alkaline stimulation could upregulate the gene expression of bone gamma-carboxyglutamate protein, a late-stage odontoblast marker.

Conclusion: This study is the first to report IRR expression in DPSCs and suggests its responsible role in dentin mineralization.

MP1-92 「Epigenetic regulation of HNF6 in biliary atresia」

Liting Yu¹, Soichiro Sonoda¹, M. Majd Sharifa¹, Arwa Mohamed Aboelmaged¹,
Lisha Dai, Ying Liu¹, Mhd Fouad Zakaria¹, Yukari Kyumoto-Nakamura¹,
Hiroki Kato¹, Takayoshi Yamaza¹
(¹Kyushu Univ Fac Dent Sci, Sect Mol Cell Biol Oral Anat)

Background: Biliary atresia (BA) is a rare congenital bile duct blockage. The unknown molecular pathogenesis makes it hard to develop alternative therapies. Our established BA-specific stem cells expressed elevated hepatocyte nuclear factor 6 (HNF6). This study aims to investigate the epigenetic mechanism of elevated HNF6 in BA-specific stem cells.

Methods: Our established BA-specific stem cells were analyzed by western blot and immunofluorescence (IF) to detect the protein and nuclear localization of candidate transcription factors, Brahma-related gene 1 (BRM1), Brahman (BRM), and nuclear factor kappa B subunit P65 and P50. They were also assessed by chromatin immunoprecipitation-qPCR (ChIP-qPCR) and ChIP-

re-ChIP-qPCR to detect them and their complexes around the HNF6 promoter region.

Results: BRM and nuclear factor kappa B subunit P65 and P50 were enriched around the HNF6 promoter in BA-specific stem cells, but not BRG1.

The BRM-P65 complex is significantly bound around the HNF6 promoter in BA-specific stem cells.

Conclusion: The BRM-P65 complex plays a key role in epigenetic chromatin remodeling around the HNF6 promoter in BA-specific stem cells.

MP1-93 「Tumor-derived Apoptotic Vesicles Modulate Lymph Node Immune Microenvironment via Fibroblastic Reticular Cells」

M Majd Sharifa¹、Soichiro Sonoda¹、Reona Aijima²、Ying Liu¹、
Mhd Fouad Zakaria¹、Yukari Kumamoto-Namakura¹、Hiroki Kato¹、
Yoshio Yamashita²、Takayoshi Yamaza¹

(¹Kyushu Univ Fac Dent Sci, Sect Mol Cell Biol Oral Anat、²Saga Univ Fac Med, Dep Oral Maxillofac Sur)

Background: Cancer cells can metastasize early to lymph nodes (LNs), whereas the mechanism of pre-metastatic niche conditioning remains unclear. In this study, we aim to investigate the effects of apoptotic vesicles (ApoVs) derived from dying cancer cells on targeting fibroblastic reticular cells in LNs (LNFRCs), key regulators of LN immunity.

Methods: We isolated LNFRCs from murine LNs. LNFRCs were primed by ApoVs extracted from staurosporine-treated human oral squamous carcinoma cell line HSC-3 cells, which possess a high metastatic potential. ApoV-primed LNFRCs

were analyzed for T-cell modulation under coculture with CD3/CD28-activated LN cells.

Results: LNFRCs exhibited stromal and antigen-presenting markers. ApoV-precondition reduced the CD8⁺ and CD4⁺ T-cell population one day after coculture and depleted the CD8⁺CD44⁺ high and CD4⁺CD44⁺ population. In contrast, ApoVs induced LNFRC apoptosis after 3 days under serum-depleted conditions.

Conclusion: Cancer cell-derived ApoVs suppress T-cell immunity and viability of LNFRCs. This dual mechanism is suggested to prime LNs for metastasis.

MP1-94 「The role of VEGFR2 expression in oral squamous cell carcinoma progression. 口腔扁平上皮癌における血管内皮細胞増殖因子受容体2 (VEGFR2) 発現の働き」

Li-Jie Li^{1,2}、宇佐美 悠^{1,3}、寺本 朱里^{1,4,5}、廣瀬 勝俊^{1,3}、豊澤 悟¹

(¹阪大 院歯 口腔病理、²台湾台北医学大学 歯学研究科、³阪大 感染症総合教育拠点、⁴阪大 院歯 口外2、⁵済生会吹田病院 口外)

Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) promotes angiogenesis and regulates endothelial cell proliferation through nuclear translocation upon VEGFA binding. In a 4-NQO-induced oral squamous cell carcinoma (OSCC) mouse model, VEGFR2 inhibition (VEGFR2i) delayed progression to SCC, suggesting roles beyond angiogenesis. This study examined VEGFR2 expression and function in OSCC. Spatial transcriptomics revealed elevated VEGFR2 and VEGFA in mouse cancer regions.

Immunohistochemistry (IHC) confirmed increased nuclear VEGFR2 and VEGFA with cancer progression, while VEGFR2i reduced proliferation marker expression. In human OSCC, public datasets showed upregulation of VEGFR2 and VEGFA in tumors compared to normal tissues. IHC further revealed positive correlations between nuclear VEGFR2, tumor stage, metastasis, and Ki67 levels. In vitro, VEGFA enhanced cytoplasmic and nuclear VEGFR2 expression and promoted proliferation in both primary mouse SCC and human OSCC cells,

which was suppressed by VEGFR2 blockade. These findings suggest the VEGFA-VEGFR2 axis drives

OSCC progression and highlight VEGFR2 as a potential therapeutic target.

MP1-95 「Deamidation of NF- κ B p65 at N139 enhances proliferation and anti-apoptotic properties in oral squamous cell carcinoma cells」

Yiran Tu¹、Jing Gao¹、Takenobu Katagiri²、Eijiro Jimi^{1,3}

(¹Kyushu Univ Fac Dent Sci, Lab Mol Cell Biochem、²Saitama Med Univ, Div. Biomed Sci, RCGM、³Kyushu Univ Fac Dent Sci, OBT Res Cent)

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignant tumor of the oral cavity and head and neck region. Deamidation, a post-translational modification, often alters protein structure and function. Two deamidation sites in p65, a subunit of NF- κ B, N64, and N139 have been identified in cancer cells, but their roles remain unclear. In this study, endogenous p65 was knocked out (KO) in SCCVII cells using CRISPR-Cas9, followed by transfection with Flag-tagged p65 variants: wild-type (WT), N64D, N139D, and double mutant (N64D/N139D; DD). Luciferase assays showed that N139D and DD

mutants significantly reduced p65 transcriptional activity, while N64D had no effect, suggesting that deamination at N139 (N139D) is critical for regulating the transcriptional activity of p65. Stable cell lines expressing Flag-tagged WT, N64D, N139D, and DD were generated. Compared to WT, N139D exhibited the highest proliferation rate, followed by DD, while N64D matched WT. Upon TNF α stimulation, N139D and DD mutants showed enhanced resistance to cell death. These findings suggest that the N139D mutation in p65 positively regulates proliferation and anti-apoptotic properties in OSCC cells.

日時：9月6日（土）9:00～17:30

会場：ポスター会場（会議場1階 イベントホール）

モリタ優秀発表賞審査「学部学生」（MP2-01～10）

MP2-01 「トガリネズミ科の実験動物スunksを用いた連続した歯列のパターン形成のモデル」

田中 裕太郎¹、山中 淳之¹、後藤 哲哉¹

(¹ 鹿大 院医歯 機能形態)

【背景】歯列のパターン形成、つまり、歯がどの位置に、どのタイミングで形成されるのかを制御するメカニズムについてはあまり良く分かっていない。齧歯類マウスの歯列は高度に特殊化しているので、哺乳類一般の歯列形成を調べるのに適していない。そこで、全ての歯種を揃え、乳歯胚と永久歯胚の2世代の歯胚を有する真無盲腸目トガリネズミ科の実験動物スunks (*Suncus murinus*) を使って、歯列のパターン形成を調べた。

【材料と方法】妊娠期間30日のスunksの胎仔（E16～E30）を収穫し、顎のサイズを計測した後、上下顎から歯胚列のみを切り出し、各歯胚のサイズを計測した。その後、whole-mount *in situ* hybridizationにより歯

胚のシグナリングセンターであるエナメル結節（EK）のマーカ遺伝子 *Shh*, *Fgf4* の発現を調べ、全ての歯胚に対してEKがどの位置に、どの順番で形成されるのかを追跡した。

【結果と考察】上顎は3つ、下顎は2つの乳歯胚のEKが同時に形成されることにより歯胚形成が開始したが、顎の成長に伴い全ての乳歯胚、永久歯胚のEKは先行する隣接歯から遅れて順番に形成された。この遅延のカスケードは近心方向にも遠心方向にも作用していた。これらの結果を基に、マウスの大臼歯形成における抑制カスケードモデルを拡張した哺乳類の連続した歯列のパターン形成のモデルを提出する。

MP2-02 「唾液腺発生におけるムスカリン性アセチルコリン受容体 M1 の役割」

Xuanchi Ji¹、中村 卓史¹、高橋 かおり¹、若森 実¹

(¹ 東北大 院歯)

唾液分泌は、交感神経と副交感神経により制御される。器官完成後には、自律神経からの指令に応答するため、自律神経受容体が唾液腺器官内に適切に配置される必要がある。唾液腺の発生は上皮と間葉の相互作用により主に制御されているが、自律神経系からの神経性シグナルの関与も近年注目されている。とくに副交感神経終末から放出されるアセチルコリン（ACh）は、唾液腺発生の初期段階から合成されており、唾液腺上皮細胞にはムスカリン性アセチルコリン受容体（mAChR）が発現していることが明らかとなっている。mAChR M1（M1受容体）およびmAChR M3（M3受容体）ノックアウトマウスが、いずれも唾液分泌量の低下を示すことが報告されているが、これら

のマウスの唾液腺発生は十分には解析されていない。本研究では、M1受容体ノックアウトマウスの唾液腺組織および唾液腺上皮細胞株を用いて、M1受容体が唾液腺の分枝形成や上皮細胞の分化決定に与える影響を解析した。その結果、発生中の唾液腺上皮では主にM1受容体が発現し、特にM1受容体が唾液腺上皮細胞の増殖と腺房細胞への分化において重要な役割を担うことが明らかとなった。さらに、M1受容体ノックアウトマウスでは腺房細胞の分化が抑制されており、M1受容体が発生初期から唾液腺上皮細胞の器官形成と機能的成熟に寄与することが明らかとなった。本発表ではこれらの結果を考察し、M1受容体の唾液腺発生における新たな発生制御機構について議論する。

MP2-03 「共焦点レーザー顕微鏡を用いた骨細胞のイメージング観察と機能解析」

伊藤 才造¹、谷村 明彦²(¹ 北医療大 歯 5 年、² 北医療大 歯 薬理)

【目的】近年、骨代謝や体内の電解質代謝における骨細胞の重要性を示唆する新しい知見が増えている。

本研究では、蛍光物質を使って細胞および骨基質の石灰化部をラベルし、組織透明化技術と共焦点レーザー顕微鏡を使ったイメージング観察によって、骨細胞の3次元解析を行っている。また、生きた頭頂骨と新規低親和性Ca²⁺プローブ (KLCA301または501) を用いて、骨細胞周囲の細胞外Ca²⁺濃度の解析を試みる。

【方法】カルセインやアリザリンレッドを加えた培養液中でマウスから摘出した頭頂骨を培養して、骨の石灰化部を染色した。この骨組織をパラホルムアルデヒドで固定後、蛍光ファロイジンで骨細胞を染色して共焦点レーザー顕微鏡を用いて、骨細胞の突起や骨小腔

の立体構造を観察した。

【結果と考察】低倍率の観察像では、骨表面や骨基質の骨髄の境界部にカルセインにより染色された石灰化部や蛍光ファロイジンで染色された骨表面の骨芽細胞や骨深部の骨細胞等が観察された。高倍率では蛍光ファロイジンで染色された骨細胞の細胞体および細胞突起の周囲に、カルセインが沈着した骨基質が観察され、三次元的観察で骨細胞の突起同士が繋がったネットワーク構造が観察された。今後、未固定の骨組織と新規低親和性カルシウムプローブを使って、骨小腔内のCa²⁺濃度の算定を試みる。

【結論】培養頭頂骨を使っイメージングによって骨細胞の機能を解析する。

MP2-04 「食酢および酒類の生化学的特性に基づく酸蝕リスクの総合評価」

小林 英里香¹、花井 亮太¹、安彦 友希¹、鷲尾 純平¹、高橋 信博¹(¹ 東北大 院歯 口腔生化)

【目的】酸蝕症は細菌を介さず酸によって歯が脱灰される現象である。近年「飲む酢」の人気の高まり、また日本酒等の伝統酒は食事や会話とともにゆっくり味わうスタイルが一般的で、口腔内に長く滞留する機会がある。これら飲料の酸蝕リスクの評価には、pHに加え、pH緩衝能、カルシウム (Ca)、リン酸 (P)、フッ素 (F) のイオン濃度を考慮する必要がある。そこで本研究ではこれらの因子を測定し、酸蝕リスクを総合的に評価した。

【方法】市販の食酢 (5種)、日本酒 (2種)、焼酎 (2種)、ウイスキー (1種) を対象とした。食酢は飲用の推奨濃度に脱イオン水で希釈した。pH、pH緩衝能、F濃度は複合電極、Ca、P濃度は比色法 (OCPC法、Fiske-

Subbarow法) にて測定した。

【結果および考察】食酢ではCa (34.2 ~ 207.8 μg/mL)、P (7.2 ~ 419.9 μg/mL)、pHは2.6 ~ 3.6、pH緩衝能は6.2 ~ 85.5 mL (8倍に希釈した試料 (8 mL) を中和するのに必要な 0.01 M NaOH量) であった。酒類ではCa (0.6 ~ 32.7 μg/mL)、P (0 ~ 84.7 μg/mL)、pHは4.1 ~ 7.2、pH緩衝能は0 ~ 1.6 mLであった。Fは全飲料で低値 (0 ~ 0.4 ppm) であった。

食酢のCa、Pは高く、ヒドロキシアパタイトの溶解を抑制する可能性はあるが、pHが低く、pH緩衝能が大きいため、酸蝕リスクが高いと考えられた。一方、酒類はCa、P、pHが低いもののpH緩衝能は小さく、唾液存在下では酸蝕リスクは相対的に低いと考えられた。

MP2-05 「インフルエンザウイルス感染に対する S-PRG フィラー抽出液の抗ウイルス効果」

五井 麻由里¹、神尾 宜昌¹、今井 健一¹(¹ 日大 歯 感染免疫)

インフルエンザは高齢者において重症化しやすく、死に至ることも多いため、その予防は極めて重要である。演者らはこれまで、ウイルス感染と口腔細菌との関係に着目し、歯科医療によるインフルエンザ予防の可能性について検討してきた。今回、実際の臨床現場におけるインフルエンザ予防の可能性を検討するた

め、歯科材料に応用されているS-PRGフィラーに着目した。S-PRGフィラーは、コンポジットレジンや歯ブラシなどに応用されており、6種のイオン (フッ化物、ストロンチウム、ホウ酸、ナトリウム、アルミニウム、ケイ酸) を放出することにより、口腔環境の健全化に寄与することが報告されている。本研究では、S-PRG

フィラーを蒸留水に24時間浸漬して得られた抽出液が、インフルエンザウイルス感染に及ぼす影響を検討した。イヌ腎臓由来上皮細胞株 (MDCK細胞) にインフルエンザウイルスA/Udorn/307/72 (H3N2)をMOI 0.001で感染させた後、S-PRGフィラー抽出液を含む培養液で24時間培養を行なった。培養上清を回収し、プラークアッセイによりウイルス力価を測定した。その結果、

S-PRGフィラー抽出液は濃度依存的にウイルス力価を有意に低下させた。以上の結果から、S-PRGフィラーを含有する歯科材料の使用が、インフルエンザの発症および重症化予防に貢献する可能性が示唆された。現在、S-PRGフィラー抽出液による抗ウイルス効果のメカニズムを解析中である。

MP2-06 「炎症性痛覚過敏に関わる侵害受容性二次ニューロンの過興奮性に対するアスタキサンチンの効果：NSAIDs との比較」

千田 理彩子¹、武田 守¹

(¹ 麻布大 生命・環境 食品生理)

アスタキサンチン(AST)は *in vitro*でNSAIDsと同様にCox-2の発現を抑制することが報告されているが、*in vivo*での効果は不明である。本研究は、炎症性痛覚過敏の緩和に対するAST の効果を検討し、ASTがセレコキシブ(CEL)の代替となるか否か解析した。Wistar 雄ラットを、口髭部に0.9%NaClを投与したNaïve群、起炎物質(CFA)を投与したCFA炎症群、CFA+AST投与群、CFA+CEL投与群に分けた。口髭部に対してvon Frey hairs を用いて逃避反射閾値を測定し、炎症性痛覚過敏を判定してASTまたはCELの投与によって緩和されるか否かを評価した。次に、三種混合麻酔を行い頸部を外科切開しSpVc領域を露出した。この部位にタングステン記録電極を刺入し口髭部への機械刺激に応

じるSpVc単一ニューロンの活動電位の細胞外記録を行い、Power Labシステムにより過興奮の指標を評価した。CFA群の逃避反射閾値は Naïve 群と比較し有意に低下した。AST, CEL投与群の逃避反射閾値は炎症2日目にNaïve群レベルにまで回復した。CFA群で確認された炎症性痛覚過敏に関わるSpVcニューロンの機械刺激閾値の低下、誘発放電頻度の増加、自発放電頻度の増加、受容野サイズの拡大はAST, CEL投与群においてNaïve群レベルにまで回復した。本研究により、ASTの投与が主に炎症部位のCox-2シグナルカスケードを阻害した結果、侵害受容性二次ニューロンの過興奮を減弱させることにより、炎症性痛覚過敏を緩和することが推察された。

MP2-07 「侵害受容性一次ニューロンの興奮性に対する“エピガロカテキンガレート”の局所麻酔効果の検討：リドカインとの比較」

宇都木 正悟¹、武田 守¹

(¹ 麻布大 生命・環境 食品生理)

エピガロカテキンガレート(EGCG)は*in vitro*において一次感覚ニューロンのNavチャンネル電流の抑制とKvチャンネル電流促進や酸感受性チャンネルASIC3を阻害することが報告されている。本研究では、侵害機械刺激に応じる三叉神経節 (TG) ニューロンの単一ユニット放電に対するEGCG局所投与による修飾効果の有無を検討し、リドカインと麻酔効果を比較することを目的とした。Wistar雄ラットを用い、三種混合麻酔薬で麻酔を行った。大脳皮質よりTGに刺入したタングステン記録電極と交流アンプに接続したPower Labを使い、口髭部分へvon Frey hairを用いた機械刺激に応じる細胞外単一ユニットを記録し、放電頻度に対するEGCGと1%リドカインの局所投与の効果を経時的に記録し、

解析した。口髭部分に受容野を持ち、非侵害・侵害刺激に応じて発火頻度が増加する単一TGニューロン活動を細胞外より記録した。EGCGの投与によってTGニューロンの放電頻度は5分後をピークに減少し、投与後20分以内で回復する可逆的效果を示す傾向が見られた。またEGCGの投与により、機械刺激に応答するTGニューロンの発火頻度の抑制率は濃度依存性に増大した。1%リドカイン(37mM)とEGCG (10mM) の抑制率はほぼ同等であった。本研究において、一次侵害受容ニューロンの興奮性が、EGCGによりNavチャンネル抑制とKvチャンネル促進とASIC3抑制により起動電位と活動電位の両者を抑制することで局所麻酔効果を発揮することが示唆された。

MP2-08 「舌運動に関与する大脳皮質の部位について」

樽元 淳也¹、佐藤 文彦¹、堤 友美^{1,2}、孫 在隣¹、橘 吉寿^{1,3}、吉田 篤^{1,4}、古田 貴寛¹

(¹ 阪大 院歯 口腔解剖 2、² 兵庫医大 院医 解剖 (神経科学)、³ 神戸大 院医 生理、⁴ 宝塚医療大 保健医療)

咀嚼、嚥下、構音、呼吸を円滑に行うには、顎の動きに加え、舌の協調した動きが不可欠であるが、これらの舌運動調節に関しては未だ十分に解明されていない。本研究では、舌下神経核へ入力する運動前ニューロンが存在する延髄腹外側部網様体へ下行投射する大脳皮質ニューロンの分布と、舌下神経核へ直接投射する大脳皮質ニューロンの分布とを調べた。イソフルラン麻酔下のラットで、舌下神経の電気刺激に対する神経応答を記録して舌下神経核を同定し、その部位またはそれよりやや腹外側へ逆行性神経トレーサーであるCholera Toxin B subunit (CTb)を微量注入した。標識細胞を大脳皮質運動野と感覚野で調べた。その結果、舌下神経核へ注入した例では大脳皮質に標識細胞をほ

とんど認めなかった。一方、舌下神経核への運動前ニューロンが存在する舌下神経核の腹外側部網様体へ注入した例では、大脳皮質一次運動野(M1)の吻側および大脳皮質二次運動野(M2)の吻側3分の1、大脳皮質一次体性感覚野(S1)の吻側4分の1に多くの標識細胞が認められた。また、M1、M2、S1のいずれの部位においても両側性に多くの標識細胞が認められたが、注入部位に対して反対側の方が優位に多かった。以上より、大脳皮質から舌下神経核へ直接情報を送らず、運動前ニューロンを介することで複雑かつ繊細な舌運動の発現と、咀嚼を含む顎運動、嚥下、構音、呼吸などと協調した運動に関与していると考えられる。(COI:なし)

MP2-09 「塩味嗜好性と女性ホルモンとの関連解析」

吉松 昌悟¹、西原 咲希¹、乾 千珠子^{2,3}、河野 彰代^{2,4}、脇坂 聡^{2,5}、本田 義知³、大庭 伸介²

(¹ 阪大 歯学部、² 阪大 院歯 口腔解剖 1、³ 大歯大 口腔解剖、⁴ 大手前短大 歯科衛生、⁵ 関西女子短大 歯科衛生)

味覚障害は高齢女性で多く認められるがその原因は不明である。高齢期の女性ホルモン低下が特に塩味に影響を及ぼすことが報告されているが、その機序は明らかではない。本研究では女性ホルモン低下と塩味嗜好性との関連を明らかにすることを目的とした。卵巢摘出雌性SDラット(OVX)と低亜鉛食で飼養した雌性SDラット(低亜鉛)において、48時間二ビン選択法により塩味嗜好性を検討するとともに、有郭乳頭の上皮性ナトリウムチャネル受容体(ENaC α , β , γ)発現量をRT-qPCR法により調べた。OVX群では対照群と比べ、0.3 Mおよび0.6 M NaClに対する嗜好性が上昇した。OVX群への女性ホルモン(β -estrogen progesterone in oil)投与により、上昇した塩味嗜好性は対照群

と同程度の値に戻った。OVX群のENaC β の発現量は対照群と比べ有意に減少する一方、ENaC α は減少傾向、ENaC γ は増加傾向を示した。OVX群への女性ホルモン投与によりいずれのENaC発現量も対照群と同程度の値に戻った。また、低亜鉛群では対照群に比べ、0.3 Mおよび0.6 M NaClに対する嗜好性が有意に上昇した。低亜鉛群への女性ホルモン投与により、上昇した塩味嗜好性は対照群と同程度の値に戻った。低亜鉛群のいずれのENaC発現量も対照群より増加の傾向を示したが、女性ホルモン投与により対照群と同程度の値に収束した。以上より、女性ホルモン低下による味覚障害には女性ホルモン補充療法が有効である可能性が示唆された。

MP2-10 「3歳児における母子の *Streptococcus mutans* 保有とう蝕との関係」名本 瑛理¹、影山 伸哉¹、朝川 美加李¹、竹下 徹¹(¹ 九大 院歯 口腔予防)

【目的】 *Streptococcus mutans* (Sm) はう蝕病原性細菌として知られており、小児う蝕のリスク要因と考えられている。本研究では、3歳児とその母親のSm保有と3歳児のう蝕との関係性について調べた。

【方法】 福岡市東区で行われた3歳児健診を受診した294名（双子を3組含む）とその母親を解析対象者とし、舌スワブ検体の採取を行った。得られた585検体からDNAを抽出したのち、リアルタイムPCR法を用いて各検体中のSmを検出した。

【結果】 母親では229名（78.8%）からSmが検出されたのに対し、3歳児では19名（6.5%）からのみ検出され、その検出率は3歳児で有意に低かった。3歳児では18名

（6.1%）においてう蝕が認められたが、Sm未検出児では12名（4.4%）、Sm検出児では6名（31.6%）においてう蝕が認められ、その有病率はSm検出児で有意に高かった。また、Sm未検出の母親の児63名からはう蝕は検出されず、Smが検出された母親の児からのみう蝕が検出された。一方、母親のSm検出は児のSm検出とは有意に関連していなかった。

【結論】 自身のSm保有のみならず、母親のSm保有も3歳児のう蝕有病率と関連していた。一方、母親のSm保有は児のSm保有と相関しておらず、児のう蝕への関わりについてはさらなる検討が必要である。